



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Identificación de cepas del virus de Bronquitis  
Infecciosa aviar en pollo de engorde del Departamento  
de Lima**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magister en Biotecnología

**AUTOR**

Rosa Isabel GONZÁLEZ VÉLIZ

**ASESOR**

Dra. María Elena SALAZAR SALVATIERRA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Gonzáles, R. Identificación de cepas del virus de Bronquitis Infecciosa aviar en pollo de engorde del Departamento de Lima [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2017.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

**Código Orcid del autor (dato opcional):**

0000-0003-3091-0980

**Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio):**

0000-0002-5661-4752

**Grupo de investigación:**

Grupo de investigación en aves (GINAVES)

**Institución que financia parcial o totalmente la investigación:**

Ninguno

**Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas.**

Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Av. Circunvalación 28, San Borja 15021

Coordenadas geográficas: 12°04'54.1"S 76°59'15.7"W

**Año o rango de años que la investigación abarcó:**

Mes y año que inicio: Enero 2005

Mes y Año que culminó: Diciembre 2014

**DNI del autor:**

10300467



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú. Decana de América  
Facultad de Farmacia y Bioquímica  
UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR  
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**

Siendo las **13:00 hrs. del 26 de junio de 2017** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes e integrado por los siguientes miembros: Dra. María Elena Salazar Salvatierra (Asesora), Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández, Mg. Luis Antonio Hoyos Sifuentes y el Mg. Julio Reynaldo Ruíz Quiroz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"Identificación de cepas del virus de Bronquitis Infecciosa Aviar en pollo de engorde del Departamento de Lima"**, presentado por la Bachiller en Biología **ROSA ISABEL GONZÁLEZ VÉLIZ**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Biotecnología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

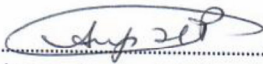
A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

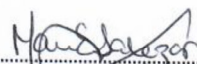
DIECIOCHO (18) MUY BUENO

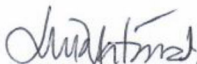
Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Biología **ROSA ISABEL GONZÁLEZ VÉLIZ**, el Grado Académico de Magíster en **Biotecnología**.

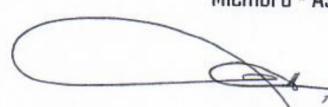
Siendo las 14:25 hrs. se levanta la sesión.

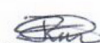
Se extiende el acta en Lima, a las 14:30 hrs. del 26 de junio de 2017.

  
Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P.P., T.C.)  
Presidenta

  
Dra. María Elena Salazar Salvatierra (P.P., T.C.)  
Miembro - Asesora

  
Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (P. Asoc. T.C.)  
Miembro

  
Mg. Luis Antonio Hoyos Sifuentes (P. Aux. T.C.)  
Miembro

  
Mg. Julio Reynaldo Ruíz Quiroz (P. Asoc., T.C.)  
Miembro

Observaciones:

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

### CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática	1
1.2. Formulación del problema	2
1.3. Justificación teórica	2
1.4. Justificación práctica	3
1.5. Objetivos	
1.5.1. Objetivo general	3
1.5.2. Objetivos específicos	3

### CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación	4
2.2. Antecedentes de investigación	4
2.3. Bases teóricas	14
2.3.1 Historia del virus	14
2.3.2 Distribución geográfica	14
2.3.3 Agente etiológico	15
2.3.3.1. Estructura y composición	16
2.3.3.2. Replicación viral	20
2.3.3.3. Variación antigénica	21
2.3.3.4. Protectotipo y genotipo	21
2.3.3.5. Serotipos del virus de Bronquitis Infecciosa	22
2.3.4. Patogenia	22
2.3.5. Transmisión	24
2.3.6. Susceptibilidad a agentes físicos y químicos	24
2.3.7. Signos clínicos	25
2.3.8. Lesiones	26
2.3.8.1. Macroscópicas	26
2.3.8.2. Microscópicas	27

2.3.9 Respuesta inmune	27
2.3.9.1. Inmunidad innata	27
2.3.9.2. Inmunidad adquirida	28
2.3.9.3. Inmunidad local	29
2.3.9.4. Inmunidad celular	29
2.3.9.5. Anticuerpos humorales	30
2.3.9.6. Anticuerpos maternos	30
2.3.10. Mortalidad y morbilidad	30
2.3.11. Diagnóstico	31
2.3.11.1. Aislamiento e identificación	31
2.3.11.2. Serología	31
2.3.11.3. Pruebas moleculares	32
2.3.11.4. Otras pruebas diagnósticas	33
2.3.12. Vacunas	33
2.3.12.1. Reacciones pos vacunales	34
2.3.13. Prevención y control	34

### **CAPÍTULO III: METODOLOGÍA**

3.1. Lugar y tiempo de estudio	36
3.2. Material	36
3.2.1. Material biológico	36
3.3 Métodos	36
3.3.1. Toma de muestras	36
3.3.2. Necropsia	37
3.3.3. Aislamiento viral	37
3.3.4. Recuperación viral y observación de lesiones	37
3.3.5. Detección viral por PCR convencional y PCR en tiempo real	38
3.3.6. Optimización de RT-PCR-RFLP	38
3.3.7 Extracción de ARN	38
3.3.8. RT-PCR	39
3.3.9. Electroforesis en gel de agarosa	40

3.3.10. RFLP	41
3.3.11. RT-PCR en tiempo real	41
3.3.11.1 Transcriptasa reversa	42
3.3.12. Análisis de resultados	44
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b>	
4.1 Necropsia	45
4.2 Aislamiento viral:	47
4.3 Pruebas Moleculares	48
4.3.1 RT-PCR convencional	48
4.3.2 RFLP	49
4.3.3. RT-PCR en tiempo real	50
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN</b>	54
<b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES</b>	57
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	58
<b>ANEXOS</b>	



## **INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Característica de los cebadores usados en la RT-PCR para la detección del vBIA.

Tabla 2. Concentración de la mezcla de reacción para la RT-PCR en un solo paso.

Tabla 3. Ciclos de la a RT-PCR en un solo paso.

Tabla 4. Característica de los cebadores usados en la prueba de PCR en tiempo real para la detección del vBIA.

Tabla 5. Concentración de la mezcla de reacción para la RT-PCR en tiempo real.

Tabla 6. Programa de PCR en tiempo real.

Tabla 7. Número de animales con lesiones respiratorias compatibles con BIA procedentes de 176 granjas del departamento de Lima.

Tabla 8. Número de embriones con signos a VBIA post inoculación de órganos.

Tabla 9. Resultados de la detección e identificación del vBIA en pollos de engorde del departamento de Lima desde el año 2005 al 2014.

## **INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Distribución mundial de la Bronquitis infecciosa Aviar.

Figura 2. Virus de la Bronquitis infecciosa Aviar.

Figura 3. Representación esquemática del virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar.

Figura 4. Modelo del homotrímero de la proteína S. y mapa lineal de la proteína S.

Figura 5. Representación esquemática del genoma del vBIA.

Figura 6. Aves con depresión.

Figura 7. Ave con dificultad respiratoria.

Figura 8. Ave con celulitis del sub cutis.

Figura 9. Aves con severa congestión nasal.

Figura 10. Ave con traqueítis moderada.

Figura 11. Ave con severa aerosaculitis.

Figura 12. Embriones Inoculados con la Cepa de desafío Massachusetts M41.

Figura 13. Granja B. Embriones con enanismo y encorvamiento severo.

Figura 14. Resultados de productos amplificados de ADNc de ARN en gel de agarosa.

Figura 15. Patrones de RFLP de una muestra positiva al vBIA.

Figura 16. Detección del vBIA por la prueba de PCR en tiempo real, en una granja de pollos de engorde del departamento de Lima.

Figura 17. Detección del vBIA por la prueba de PCR en tiempo real, en una granja de pollos de engorde del departamento de Lima, con curvas de disociación diferente al control positivo

## RESUMEN

El virus de la Bronquitis Infecciosa aviar (vBIA) es un gamacoronavirus que causa una enfermedad altamente contagiosa del mismo nombre de gran impacto económico en la producción avícola mundial. El presente estudio tuvo como objetivo, identificar las cepas circulantes del virus de la Bronquitis infecciosa aviar en pollos de engorde del departamento de Lima mediante pruebas moleculares. Se colectaron muestras de tráquea y tonsilas cecales de 880 pollos de engorde de 3 a 6 semanas de edad que presentaban signos clínicos respiratorios moderados a severos y a la necropsia lesiones compatibles con Bronquitis infecciosa aviar; procedentes de 176 granjas, desde el año 2005 al 2014. Mediante la prueba de aislamiento viral se identificaron 92 muestras por las lesiones severas en el embrión compatibles con el vBIA. Por pruebas moleculares de RT-PCR en punto final y RFLP hasta el año 2010 y PCR en tiempo real a partir del año 2011; se detectaron en total 78 cepas del vBIA; determinándose que en su mayoría corresponden al serotipo Massachusetts, (72, 44.31%), y las restantes, al serotipo Connecticut (2, 1.13%) y otros serotipos no identificados (4, 2.27%) con un rol menor en la ocurrencia de los procesos respiratorios por Bronquitis infecciosa en la industria avícola en el departamento de Lima- Perú.

**Palabras claves:** Bronquitis Infecciosa aviar, aislamiento viral, RT-PCR.

## **ABSTRACT**

Avian Infectious Bronchitis virus (vBIA) is a gammacoronavirus that causes a highly contagious disease of the same name with great economic impact on world poultry production. The objective of this study was to identify the circulating strains of the avian infectious bronchitis virus in broilers in the department of Lima through molecular tests. Trachea and cecal tonsils samples were collected from 880 broilers from 3 to 6 weeks of age who presented moderate to severe respiratory clinical signs and necropsy lesions compatible with avian infectious bronchitis; from 176 farms, from 2005 to 2014. Through the viral isolation test, 92 samples were identified for severe embryo lesions compatible with vBIA. By molecular tests of RT-PCR at endpoint and RFLP until 2010 and real-time PCR from 2011; a total of 78 vBIA strains were detected; determining that they mostly correspond to the Massachusetts serotype, (72, 44.31%), and the remaining ones, to the Connecticut serotype (2, 1.13%) and other unidentified serotypes (4, 2.27%) with a minor role in the occurrence of respiratory processes due to infectious bronchitis in the poultry industry in the department of Lima-Peru.

**Keywords:** Avian Infectious Bronchitis, viral isolation, RT-PCR.

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Situación Problemática

El virus de la Bronquitis Infecciosa aviar (vBIA) es un gamacoronavirus que causa una enfermedad altamente contagiosa del mismo nombre y tiene gran impacto económico en la producción avícola mundial; afectando el aparato reproductivo y respiratorio de las aves, y en algunos casos causa nefritis debido a nuevas cepas existentes, promoviendo pérdidas económicas que afectan a las empresas avícolas a nivel mundial (Jackwood, 2012). El primer serotipo existente del vBIA fue el serotipo Massachusetts (Mass), a partir de la década del 50 se detectó la presencia del serotipo Connecticut (Conn) y posteriormente se han detectado decenas de serotipos, donde la caracterización de la proteína S es comúnmente usada para la clasificación del vBIA en todo el mundo (Jackwood, *et al.*, 1992; Jackwood, *et al.*, 1993; Brett *et al.*, 2001; Falcone *et al.*, 1997; Keeler *et al.* 1998; Di Fabio *et al.*, 2000). Los brotes de la enfermedad son causados generalmente a nivel mundial por el serotipo Massachusetts, y como consecuencia de ello ocasiona cuantiosas pérdidas económicas (Cook *et al.* 1999, de Wit *et al.*, 2011). Sin embargo, producto de la recombinación génica y de las mutaciones que se producen en el vBIA, están emergiendo nuevos serotipos que son de difícil identificación y control (Jackwood, 2012). En los pollos de engorde, el vBIA puede persistir por mucho tiempo, y este es un factor para que nuevos serotipos aparezcan en el campo (Cook *et al.*, 1999). La bronquitis infecciosa aviar (BIA) es una de las enfermedades más conocidas y descritas desde los años 20 y a pesar del tiempo transcurrido sigue constituyendo una de las enfermedades causantes de las grandes pérdidas económicas en la avicultura a nivel mundial. (Ignjatovic & Sapats 2000).

El serotipo más común presente en los Estados Unidos es el serotipo Arkansas (Jackwood, *et al.*, 2012) otros serotipos identificados aparte de Mass y Conn, fueron descritos como Delaware, (Gelb *et al.*, 1997), Cal99 (Mondal *et al.*, 2007) y Georgia (Lee y Jackwood, 2001). A nivel mundial se han descrito diferentes serotipos, destacándose últimamente la presencia en algunos países de Sudamérica de la cepa tipo Q (Villarreal *et al.*, 2010), similares a las reportadas en el continente asiático, las que fueron denominadas como QX y Q1 (Ha *et al.*, 2011). Los estudios realizados en el Perú en pollos de engorde mediante

pruebas serológicas confirmaron la presencia del serotipo Massachusetts y Connecticut, no encontrándose anticuerpos contra los serotipos Arkansas JMK y Gray, (Negrete 1995). Así mismo Zavaleta *et al.*, en 1999 reportaron la presencia de serotipo Connecticut en fluidos alantoides analizadas mediante RT-PCR con oligonucleótidos específicos.

A nivel mundial, nuevos tipos del vBIA siguen apareciendo a causa de las mutaciones y otros eventos de recombinación del genoma viral, haciendo este virus sea difícil de identificar y muy difícil de controlar. Además, se han identificado diferentes serotipos y genotipos del virus los que no muestran protección cruzada.

En el Perú, la avicultura representa 57% del PBI pecuario, aporta el 70% de la proteína animal consumida por la población nacional, por lo que la carne de pollo constituye la principal fuente de proteína animal que se genera en el menor tiempo debido a la exigencia productiva mayor, a la que las aves son sometidas. En la industria avícola, la salud de las aves, es primordial para obtener una buena eficacia productiva, sin embargo durante los últimos años, los problemas respiratorios en las granjas avícolas se han incrementado considerablemente, siendo el vBIA uno de los principales agentes infecciosos que afectan a las aves principalmente pollos de engorde, en donde microorganismos oportunistas como *E. coli* afecta los índices productivos, agravando la infección, y produciendo una mayor morbilidad, y una mortalidad moderada. Al identificar las cepas del vBIA en los pollos de carne del departamento de Lima, las empresas avícolas podrán tomar medidas adecuadas y eficientes para el control de la BIA.

## **1.2. Formulación del Problema**

¿Será posible identificar mediante pruebas moleculares nuevas cepas del vBIA circulantes en los pollos de engorde del departamento de Lima?

## **1.3. Justificación teórica**

Los estudios realizados en el Perú mediante pruebas serológicas confirmaron la presencia del serotipo Massachusetts y Connecticut, pero no se encontraron evidencias serológicas en pollos de engorde de los serotipos Arkansas, JMK, y Gray (Negrete 1995). En 1999 mediante pruebas de RT-PCR con oligonucleótidos específicos se reportó la presencia del serotipo Connecticut (Zavaleta *et al.*, 1999). Sin embargo, la industria avícola peruana sigue

enfrentando desafíos por el vBIA, no habiéndose realizado desde el año 2000, ningún trabajo de investigación que identifique la existencia de nuevas variantes; motivo por el cual el presente estudio plantea identificar los serotipos locales presentes en el país contribuyendo a encontrar las mejores alternativas de control, por ser una enfermedad que está ocasionando un impacto socio-económico severo en la avicultura del país.

#### **1.4. Justificación práctica**

En la presente investigación fueron implementadas y estandarizadas las pruebas moleculares necesarias para un rápido diagnóstico e identificación de las cepas del vBIA en pollos que presentan problemas respiratorios compatibles con la enfermedad, permitiendo conocer los serotipos del vBIA, para contribuir con la toma decisiones y medidas sanitarias para el control de la enfermedad por vacunación.

#### **1.5. Objetivos**

##### **1.5.1. Objetivo general**

Identificar las cepas del virus de la Bronquitis infecciosa aviar en pollos de engorde del departamento de Lima mediante pruebas moleculares.

##### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Implementar y estandarizar las pruebas moleculares de RT PCR y RFLP para la detección e identificación del virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar.
- Detectar e identificar los serotipos del virus de bronquitis infecciosa en pollos de engorde con signos clínicos sospechosos de la enfermedad de granjas avícolas del departamento de Lima.

## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación**

El reconocimiento de las diferentes cepas del vBIA que emergen como consecuencia de mutaciones o recombinaciones genéticas, implica la posibilidad de estudio de fenómenos que se dan tanto en la naturaleza como en condiciones experimentales, incrementando el conocimiento sobre este agente que interfiere con el desarrollo de la avicultura y la producción de proteína de origen animal a favor de la sociedad en respuesta a la necesidad de combatir la desnutrición humana.

### **2.2. Antecedentes de investigación**

Inicialmente en los Estados Unidos de Norteamérica (EE. UU) durante los años treinta se describió a la bronquitis infecciosa aviar como una enfermedad respiratoria aguda presente sobre todo en las aves jóvenes. Estableciéndose su etiología vírica y al agente se le denominó virus de la bronquitis infecciosa aviar (Manual O, 2008). En EE. UU, los serotipos de más frecuente presentación fueron Massachusetts y Connecticut; otros serotipos como Arkansas, JMK, Florida, Delaware y 072 fueron reportados con alguna frecuencia (Rojo, 1990). Reportes de serotipos diferentes o “variantes” durante la década del setenta fueron hechos en Holanda; las cepas vacunales H52 y H120 fueron obtenidas a partir de tales cepas (Villegas, 1985).

Jackwood *et al.*, en 1992, desarrollaron un procedimiento de extracción rápida para purificar el ARN del virus de la bronquitis infecciosa, a partir del fluido alantoideo de embriones previamente inoculados. Utilizaron la prueba molecular de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT - PCR) para la amplificación del genoma viral de 8 cepas del vBIA pertenecientes a 5 serotipos diferentes, detectando los productos de la amplificación de todas las cepas estudiadas.

Kwon *et al.*, (1993), utilizaron la RT - PCR y la prueba de análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para serotipificar cepas del vBIA. Once cepas de referencia del virus de bronquitis infecciosa fueron agrupadas de acuerdo con los patrones de RFLP. Las cepas del virus de bronquitis infecciosa Holte, Arkansas DPI, SE 17,



Iowa 97 y Md 27 pudieron ser diferenciadas de otras cepas del virus de bronquitis usando la enzima de restricción HaeIII. Las cepas Beaudette, Mass 41, Conn y Florida 88 tuvieron el mismo patrón de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción usando la enzima HaeIII, pero pudieron ser diferenciadas usando las enzimas de restricción XcmI y BstYI. Las cepas Gray y JMK no pudieron ser diferenciadas por sus patrones de RFLP posterior a la digestión con 23 enzimas. Los resultados usando PCR-RFLP concuerdan con los resultados de serotipos determinados por la prueba de virus neutralización (VN) para las cepas tradicionales y variantes del vBIA.

Brett *et al.*, (2001), caracterizaron genómicamente 9 cepas del vBIA, mediante la RT-PCR-RFLP, en pollos de engorde de centros avícolas de la región central venezolana. Siete cepas correspondieron al serotipo Mass y dos a un serotipo diferente, por la no correspondencia con los patrones de RFLP, y estas cepas fueron identificadas como "variantes genotípicas". Los resultados de ambas pruebas moleculares presentaron alta especificidad y sensibilidad y son usados como pruebas diagnósticas de la enfermedad.

Falcone *et al.*, (1997), usaron el procedimiento de PCR que fue desarrollado con el fin de detectar vBIA directamente en muestras de tejido. El ARN viral fue extraído del líquido alantoideo y cultivos celulares infectados experimentalmente con diferentes cepas de vBIA y de los tejidos de aves infectadas naturalmente. El ARN viral se amplificó e identificó por un ensayo de RT-PCR anidada utilizando dos conjuntos de cebadores conservados. La secuencia seleccionada de la nucleocápside del vBIA se detectó con éxito mediante electroforesis de material amplificado.

Di Fabio *et al.*, (2000), realizaron en Brasil 15 aislamientos del vBIA en 126 parvadas avícolas de todas las edades. Las parvadas de las cuales se realizaron los aislamientos (14 de pollos y 1 de codornices) experimentaban una serie de condiciones clínicas similares a bronquitis incluyendo enfermedad respiratoria, problemas digestivos y renales, así como bajas en la producción de huevo. Una de las cepas correspondió al serotipo Mass. Las otras cepas fueron examinadas por medio de la prueba de neutralización cruzada en cultivos de anillos de tráquea, lo que indicó que pertenecían por lo menos a cuatro grupos antigénicos, todos diferentes a los descritos previamente en otros países. Algunas de las parvadas de las

cuales se realizaron los aislamientos habían sido vacunadas utilizando el serotipo Mass. Los estudios de protección mostraron que la vacuna MA5 (del serotipo Mass) protegió bien en el desafío con cuatro de estas cepas.

Nix, *et al.*, (2000). En EEUU, identificó cepas de campo mediante RT-PCR encontrando que el serotipo Arkansas fue el más común entre los años 1993 y 1997. Las cepas fueron aisladas de parvadas de pollos de engorde que mostraban enfermedad respiratoria pese a la vacunación contra dicho serotipo y fueron comparadas con las cepas de referencia mediante VN. Las cepas pudieron distinguirse de las de referencia, por un polimorfismo característico en la secuencia y la desaparición de una secuencia de 6 nucleótidos que codifican los aminoácidos 57(Asp) y 58 (Asp) en la región hipervariable 1 del gen S-1. En base a los hallazgos con VN y sus secuencias, se consideró que las cepas ArW213196, ArW15C196, ArW15291 95 y ArW1534195, pertenecían a un subtipo del serotipo Arkansas. La quinta cepa, Ark/ 1535135 podría constituir otro subtipo del serotipo Arkansas.

Wang *et al.*, (2000) demostraron que la RT-PCR-RFLP fue sensible en la detección de cepas del vBIA, Massachusetts 41 (Mass 41) y JMK; y el límite de detección para ambos fue de aproximadamente 0,15 ng de ARN viral usando electroforesis en gel. La semicuantificación relativa de Mass 41 y JMK en mezcla fue demostrada mediante RT-PCR. Para investigar más a fondo el mecanismo subyacente de la eficiencia de replicación de Mass 41 y JMK se compararon los resultados obtenidos a las 6, 12, 18, 24, 36 y 48 horas después de la inoculación de embriones. No hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre estos dos serotipos basado en los resultados a la concentración total de ARN y RT-PCR de 10 veces la dilución de ARN en los puntos de tiempo indicados. Los datos sugieren que el dominio de una cepa no es debido a la eficacia de la replicación de Mass 41 y JMK; sino un posible mecanismo mediado por receptores.

Escorcía *et al.*, (2000), aislaron 10 cepas del vBIA en pollos de engorde en los estados de Querétaro y Guanajuato en México. Los virus fueron aislados de diferentes órganos de los pollos con signos respiratorios (tonsilas cecales, riñones, pulmón y tráquea) a pesar de la vacunación recibida con las cepas Masss y Conn. de seis cepas fueron neutralizadas con anticuerpos monoclonales contra Mass, mientras que las otras cuatro no lo fueron. Además,

cuatro cepas no produjeron lesiones en embriones en los primeros cinco a siete pasajes. Estas cuatro cepas fueron caracterizadas minuciosamente por medio de las RT-PCR-RFLP. Los patrones de electroforesis de estas cuatro cepas fueron idénticos, pero diferentes de otras cepas de bronquitis conocidas.

Callison *et al.*, (2001) analizaron 11 cepas el vBIA con la RT-PCR-RFLP y mediante la secuencia del gen de la glicoproteína S1, aisladas de Holanda, Reino Unido, Israel, Italia, Venezuela y México. Dos de las cepas produjeron patrones RFLP similares a la cepa Mass 41, también se detectaron siete nuevos patrones RFLP entre las otras nueve cepas extranjeras. El análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de la glicoproteína S1 de las cepas 4/91 patógena, 4/91 atenuada y variante 1, tuvo una similitud mayor del 90% para los virus variantes pertenecientes al serogrupo 493/B, indicando que existe una posible relación antigénica. La variante 2 mostró una similitud de solamente 81,0% con los virus pertenecientes al serogrupo B Europeo, por lo tanto, es difícil predecir su serotipo. Las cepas 98-07484 y 97-8123 fueron genotípicamente diferentes y, por lo tanto, también pueden ser serológicamente diferentes.

Posteriormente, Gelb *et al.*, (2001). Identificaron 17 aislamientos de campo del vBIA provenientes de granjas de pollos de engorde de Querétaro y San Luis de Potosí en México mediante la secuenciación del gen S1 obtenido por medio de la RT-PCR. Estos lotes tuvieron una historia continua de enfermedad respiratoria complicada con *E. coli*, con porcentajes de mortalidad que alcanzaron el 28%, a pesar de recibir vacunas vivas de bronquitis infecciosa tipo Massachusetts y Connecticut. Mediante el análisis de la secuencia del gen S1, se identificaron dos genotipos únicos descritos hasta el momento sólo en México los cuales parecen representar cepas autóctonas del país. Se aisló el genotipo mexicano, Mex11765199 del 64% de los brotes respiratorios de la enfermedad. Tres aislamientos (18%) fueron similares al genotipo BL-56, el cual es un genotipo mexicano único del virus de bronquitis infecciosa observado inicialmente en 1996. Además de las dos cepas autóctonas, se encontró que tres aislamientos (18%) que fueron identificados como pertenecientes al genotipo Connecticut.

Lee *et al.*, (2001). En EE. UU entre los años 1990 y 1999 aislaron 25 cepas del vBIA, similares al serotipo DE072 pero genéticamente distintas. Estas cepas fueron analizadas por métodos moleculares y antigénicos. La prueba de virus neutralización cruzada y el análisis de la secuencia del gen S1 confirmó que los virus fueron divididos en el serotipo DE072 y otros dos grupos únicos, designándolo luego como el serotipo Georgia 98, para el cual se desarrolló un análisis con RFLP, que permitió diferenciar este nuevo serotipo de otros serotipos del virus.

Ignjatovic *et al.*, (2002) demostraron que de 25 cepas del vBIA aisladas de aves comerciales en Australia entre 1961 y 1994, doce cepas fueron nefropatógenas y 10 respiratorias, los tres restantes fueron de patogenicidad mixta. Las cepas del vBIA identificadas como nefropatógenas causaron una la mortalidad de 5-90%, y lesiones macroscópicas e histopatológicas renales, y de acuerdo con la gravedad de estas características, las cepas nefropatógenas podrían subdividirse en cepas de alta, moderada o baja patogenicidad.

Brett *et al.*, (2003) realizaron el estudio en diferentes estados de la región central venezolana (Miranda, Cojedes, Carabobo y Aragua) en donde aislaron e identificaron cepas del vBIA en aves de engorde. De las veintiuna granjas muestreadas, el 57,1 % eran vacunadas al primer día de edad con la cepa M -120. El 100% de pollos monitoreados tenían la enfermedad de tipo respiratorio en forma clínica, sin embargo, 03 lotes, presentaron la enfermedad de tipo renal. En los análisis de histopatología se evidenciaron que los riñones tenían lesiones severas y el tracto respiratorio lesiones menos permanentes. De los 21 casos analizados, el 57% tenía el vBIA, el que fue determinado por la prueba de aislamiento viral en huevos SPF. La caracterización genómica mediante la RT-PCR-RFLP, demostró que las cepas 6228 y 6328 pertenecían a un serotipo nuevo.

Dolz *et al.*, (2003), genotipificaron doce vBIA aislados en España entre los años 1992 y 2002 mediante RT-PCR y secuenciación del gen S1. Todos los virus fueron aislados mediante inoculación en embrión de pollo a partir de tráquea y/o riñón procedente de casos clínicos. Siete de estos virus fueron serotipificados mediante neutralización viral (VN) como M41, 4/91, D1466, D207 y French 84221 mientras que el serotipo de los cinco restantes no se pudo identificar mediante esta técnica. Se amplificó y se obtuvo la secuencia completa del gen S1

de los 12 virus incluidos en el estudio. El análisis filogenético de las nucleótidos y aminoácidos mostró una buena correlación entre ambas técnicas en tres de los siete aislamientos serotificados, mientras que en los otros cuatro casos se obtuvieron resultados contradictorios. De los cinco aislamientos que no se habían podido serotificar mediante VN, cuatro mostraron una enorme similitud nucleotídica y aminoacídica con la secuencia del virus Italy-02, nuevo genotipo descrito en Europa.

Alvarado *et al.*, (2005) realizaron la caracterización molecular de cepas del vBIA aisladas en Colombia en el año 2003. Aislaron 16 cepas del vBIA a partir de muestras clínicas de pollos de engorde y ponedoras comerciales provenientes de 5 zonas avícolas. Se aislaron las cepas a partir de muestras de pulmón, tráquea, y tonsilas cecales de aves con signos respiratorios previamente vacunadas con la cepa Mass. Se examinaron los aislamientos mediante el estudio filogenético de las secuencias de aminoácidos en la primera zona hipervariable del gen S1 y al ser comparadas con cepas de referencia del vBIA, se observó la presencia de 12 aislamientos distribuidos en 4 grupos genotípicos únicos, un aislamiento perteneciente al genotipo Connecticut y 3 aislamientos pertenecientes al genotipo Massachusetts

Abreu *et al.*, (2006), realizaron el análisis molecular de 15 aislados del vBIA procedentes de brotes en pollos de carne o aves ponedoras. Estos aislamientos fueron analizados mediante la RT-PCR-RFLP con las enzimas: *AvaII*, *HphI*, *Sau 96I* y *Tsp5091* mediante la secuenciación parcial del gen N, existiendo una similitud de aminoácidos que varió del 45% al 99%, demostrándose una mayor diversidad genética sobre todo antes del uso oficial de la vacunación en Brasil.

Lopez *et al.*, (2006), utilizaron la RT-PCR y secuenciación para detectar y caracterizar genéticamente virus procedentes de diferentes de aislados de vBIA en Chile. La detección del vBIA mediante la prueba de RT-PCR utilizando tejidos directamente fue semejante a la prueba de aislamiento viral, pero la sensibilidad de la prueba de RT-PCR aumentó cuando se trabajó con fluidos alantoideos que contenía el vBIA. Todos los aislados históricos chilenos fueron idénticos, ya que los productos amplificados tuvieron 193pb (de tamaño) y mostraron una semejanza entre 71% - 96%. Al momento de analizar sus secuencias, los aislamientos

tuvieron 68% y 97% de similitud con las cepas reportadas en América del norte, Asia Europa, Australia y Nueva Zelanda.

Liu *et al.*, (2006), aislaron veintiséis cepas del vBIA de brotes en pollos en China entre 1995 y 2004. Los vBIA chinos, fueron principalmente nefropatógenos, y se colocaron en siete genotipos. Catorce aislamientos de los virus chinos se colocaron en el genotipo I, teniendo pequeñas distancias evolutivas entre sí. El genotipo II incluyó 6 cepas que se aislaron en la década de 1990 en China, el genotipo III consistió de ocho aislamientos chinos que mostraron una estrecha relación con el vBIA aislado en Corea. Otros ocho vBIA aislados agrupados en el genotipo IV mostraron mayor distancia evolutiva. El serotipo Mass estuvo presente en China en 1990 y fue en un genotipo separado. Dos aislamientos, HN99 y CK / CH / LHN / 00I, podrían ser un reaislamiento de cepas vacunales, agrupados en el genotipo VI. Cuatro aislamientos de vBIA formaron otro genotipo y mostraron grandes distancias evolutivas de otros genotipos chinos (genotipo VII). Los vBIA agrupados en los mismos genotipos mostraron secuencia de aminoácidos de más de 90% similitudes, mientras que la mayoría de los virus en diferentes genotipos mostraron menos de 90%. Los resultados mostraron que el vBIA en China resultó de cambios genéticos tanto en las poblaciones de BIA que existían antes de la llegada de la vacunación y en los virus que fueron introducidos a través de vacunas vivas.

Callison *et al.*, (2006). Desarrollaron una prueba de RT-PCR en tiempo real usando la sonda marcada (Taqman®) para la detección temprana y rápida del vBIA., amplificando un producto de 143 pb en el 5-UTR del genoma virus. Quince cepas comprobadas del vBIA y dos cepas coronavirus de Turquía de fueron amplificadas con resultados negativos en otros patógenos utilizados. Completaron la evaluación con 1329 muestras de hisopos traqueales. Un total de 680 muestras recolectadas de aves negativas para anticuerpos contra el vBIA fueron negativas en la detección del virus por RT-PCR en tiempo real. También recolectaron 120 hisopos traqueales de aves infectadas experimentalmente con diferentes dosis de vBIA en seis puntos de tiempo diferentes y descubrió que, independientemente de la dosis administrada, la carga viral se mantenía en la tráquea los 5 días post inoculación y encontraron una relación inversa entre la dosis de virus administrada y la carga viral a los 14 días post inoculación. Finalmente, analizaron 300 muestras de hisopado traqueal de pollos

de engorde comerciales vacunados contra el vBIA en campo evidenciando que más de la mitad de las aves se infectaron luego de la vacunación, causando la transmisión a otras aves del lote. Esta observación es significativa porque los coronavirus, que tienen una alta tasa de mutación. La prueba de RT-PCR en tiempo real fue extremadamente sensible y específica, puede usarse para distinguir rápidamente y cuantificar ARN genómico viral en muestras clínicas.

Liu *et al.*, (2008), Entre los años 2005 y 2006, usaron la prueba de RT - PCR y posteriormente secuenciaron el gen S1, para caracterizar los 12 aislamientos del vBIA en pollos comerciales de China. La cepa variante del virus CK/CH/LSD/051, diferente a los aislados nefropatógenos tuvo afinidad por el tracto respiratorio. Demostraron que el uso de la vacuna H-120, no confirió a las aves la protección necesaria contra la cepa variante, pero, la cepa heteróloga atenuada aislada en China, identificada como tl/CH/LDT3/03, tuvo mayor eficacia al momento de proteger a las aves contra la cepa CK/ CH/LSD/051. El ensayo demuestra que la mejor protección contra una cepa variante se realiza con la combinación de vacunas comercialmente disponibles o con el uso de cepas atenuadas heterólogas.

Pohuang *et al.*, (2009). En 2008, en Tailandia aislaron 13 cepas del vBIA en pollos de engorde, y luego de la amplificación de la región S1 se identificaron dos grupos: Grupo 1 con identidades de secuencia de nucleótidos inferiores al 85% representando a las cepas autóctonas de Tailandia y el grupo 2 mostró una estrecha relación con vBIA aislados de China. Este hallazgo indicó que los vBIA tailandeses identificados evolucionaron por separado y al menos dos grupos de virus se encuentran circulando en Tailandia.

Meir *et al.*, (2010). En este estudio, utilizaron RT-PCR TaqMan® en tiempo real para zonas altamente conservadas como el gen de la nucleocápside (N). La prueba fue específica para vBIA no detectando otros patógenos, incluidos los coronavirus de pavo. La RT - PCR en tiempo real y el aislamiento del vBIA fueron 17-75% más sensibles que la RT-PCR dirigida al gen S1 para prueba de hisopos traqueales directamente de pollitos infectados experimentalmente. Cuando los hisopos traqueales y cloacales de muestras clínicas se analizaron directamente, un 50% más de muestras fueron positivas por RT-PCR en tiempo

real que por el gen S1 RT-PCR. La prueba molecular dirigida al gen N fue más sensible que el permitiendo la detección rápida y precisa del vBIA directamente de muestras clínicas, facilitando el diagnóstico diferencial.

Villarreal *et al.*, (2010), detectaron diferentes linajes de cepas brasileñas del vBIA en pollo de engorde, gallinas reproductoras y de postura entre los años 2007 y 2008. Sometieron a la amplificación parcial del gen S, muestras de veinte lotes positivos al vBIA quince cepas fueron secuenciadas y agrupadas en un único tronco de las cepas de Brasil, subdivididas en 03 subgrupos denominadas: Brasil 01, Brasil 02 y Brasil 03). Se clasificaron 03 muestras como Mass, y 02 muestras procedentes de lotes con problemas respiratorios y reproductivos fueron agruparon con el genotipo 4/91 - 793B, (a esa fecha ese genotipo no había sido detectado en Brasil). El bajo nivel de identidad en la parte secuenciada del gene S hace que se discuta la relevancia de los resultados encontrados, sugiriendo que el serotipo Massachusetts tiene un nivel de protección cruzada baja.

En Cuba, el diagnóstico del vBIA se realizaba mediante el aislamiento viral. Para identificar la posible presencia del vBIA en aislados cubanos se aplicó la RT-PCR en muestras de tráquea-pulmón de once aves. Se evaluaron tres grupos (muestras clínicas) y en dos de ellos se detectaron las al vBIA, representando una figura relevante al momento de diferenciar con otras graves enfermedades respiratorias con similar cuadro clínico como la enfermedad de Newcastle o la Influenza aviar. (Acevedo *et al.*, 2010).

Dolz *et al.*, (2012), reportaron que pollos y gallinas adultas fueron infectados con el serotipo Italia 02, por vía óculo-nasal. Evaluaron los signos clínicos, hallazgos macroscópicos y microscópicos, y la detección del ARN viral mediante hibridación *in situ* (ISH) para varios tejidos, por RT-PCR en la tráquea, riñón e hisopados nasales y cloacales. El serotipo Italia 02 causó daño respiratorio grave y daño renal en un solo pollo de un día de edad, pero no en gallinas adultas en las que sólo se observó enfermedad respiratoria y caída de producción de huevos. La detección del ácido nucleico viral en el intestino por RT-PCR fue consistente, persistentemente se detectó en las heces en comparación con exudados nasales.



Biarné *et al.*, en 2011, caracterizaron mediante RT - PCR y secuenciamiento del gen S1 (parcialmente), 15 genotipos del vBIA de cepas aisladas de 25 muestras de campo de diferentes zonas de España con sospecha de BIA. El estudio molecular demostró la presencia de 3 genotipos de vBIA a nivel de campo: Italy-02, QX y 793/B.

Velazco *et al.*, (2013), utilizaron el RT-PCR en un solo paso con SYB-Green para la detección del genoma del vBIA directamente de órganos. De 20 aves enfermas con signos clínicos de BIA, detectaron el genoma en 8 muestras de pulmón, tráquea y tonsilas cecales, 9 fueron positivos a tráquea y pulmón, y 3 fueron negativos en tráquea, pulmón y tonsilas cecales, se concluyó que el PCR en tiempo real puede ser utilizado como un método de “screening” del virus para un diagnóstico molecular rápido, sensible y confiable.

Marandino (2013), demostró que las cepas sudamericanas del vBIA presentaban una notoria variabilidad genética que refleja una dinámica compleja de este virus en la región; los dos genotipos (SI y A/SII) caracterizados en esta tesis varían en su distribución geográfica, y se originaron a partir de diferentes ancestros en distintos años. La recombinación pudo haber tenido un rol relevante en la evolución de las cepas sudamericanas. Las variantes sudamericanas del genotipo A/SII serían el resultado de un evento de recombinación entre variantes asiáticas y sudamericanas (genotipo SI). También se detectó un evento de recombinación intragénica en una cepa argentina.

Acevedo *et al.*, (2014), estudiaron la diversidad genética y las relaciones filogenéticas en gallinas ponedoras de las provincias Mayabeque y Artemisa- Cuba desde 2008 al 2012 evidenciando la circulación de dos genotipos nuevos, uno de ellos con un potencial nefropatogénico. Desarrollaron, además, un ensayo de RT-PCR en tiempo real basado en SYBR-Green capaz de detectar el vBIA y diferenciar en una misma reacción cepas del genotipo Massachusetts de otros genotipos. Se concluyó que la técnica es una herramienta útil para la identificación rápida de brotes y programas de vigilancia en casos sospechosos de bronquitis infecciosa, sobre todo en países con un programa de vacunación.

## **2.3. Bases teóricas**

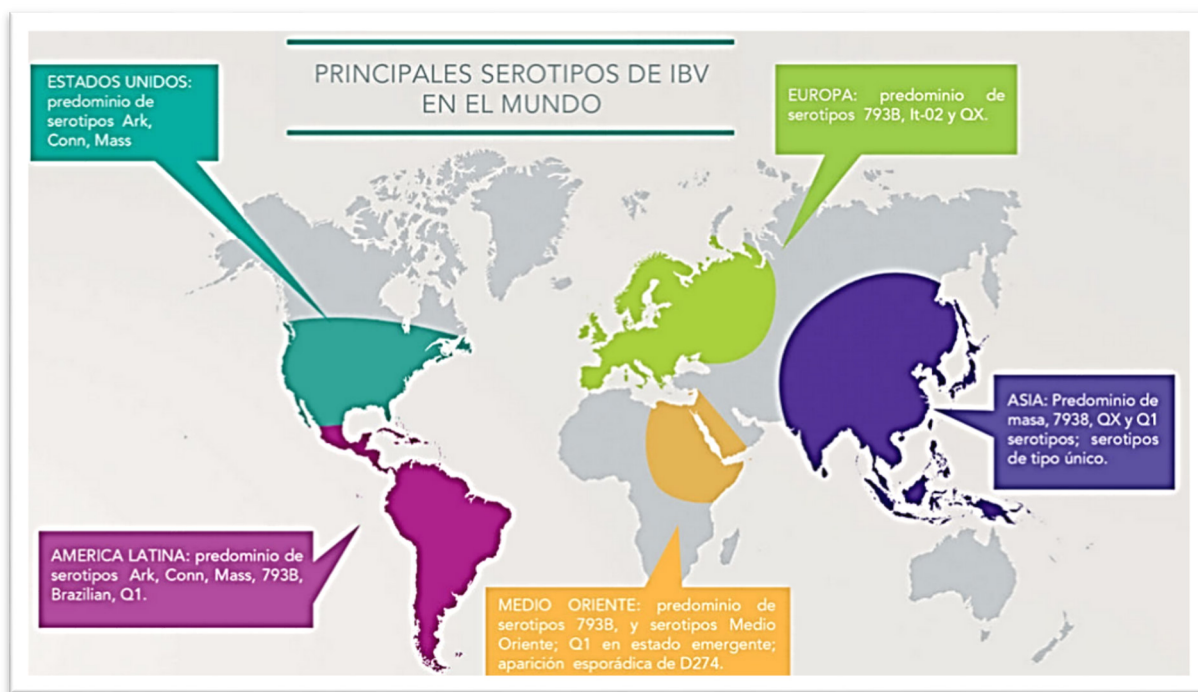
### **2.3.1. Historia del virus**

En Dakota del norte de los Estados Unidos, Schalk y Hawn (1931) reportaron la enfermedad ronquitis infecciosa aviar (BIA) por primera vez y posteriormente otros reportes fueron realizados por Bushnell y Brandly en 1933, y por Beach y Schalm en 1936 sobre un brote de la enfermedad en California. En 1937 Beaudette y Hudson demostraron que el vBIA se podía propagar en la cavidad alantoidea de huevos embrionados del pollo. La primera vacuna contra el vBIA fue desarrollada en por Roeckel en 1941 y fue conocida como la M41 o Mass 41, (cepa aislada en la Universidad de Massachusetts). En los inicios 1960, la BIA fue diagnosticada una granja Huyben en Holanda, y esto permitió el desarrollo de las vacunas H120 y H52 que actualmente son usadas a nivel mundial (Jackwood y de Wit ,2013). En 1956 Jungherr reportó que la cepa de BIA aislada en Connecticut, no protegía a los pollos desafiados con la cepa Mass. En la década de 1960 Whiterfield y Hitchner reportaron una cepa de BIA que causaba nefritis y fue conocidas como la cepa Gray y Holte. (Fabricant, 1998).

La BIA se puede presentar en todo tipo de aves como reproductoras o ponedoras, pero al comienzo se la identificó como la enfermedad de las aves jóvenes, causando en ellas elevada morbilidad y baja mortalidad. (Cavanagh & Naqi, 2003).

### **2.3.2 Distribución geográfica**

La BIA es de distribución mundial. En EE. UU, muchos serotipos diferentes al identificado originalmente, Massachusetts, han sido reportados desde los inicios de la década de los 50. En Europa y en Asia cepas del tipo Mass han sido aisladas desde 1940 (Cavanagh y Gelb, 2008). Muchos serotipos y genotipos han sido detectados en todos los continentes, excepto en la Antártida (Figura 1).



**Figura 1. Distribución mundial de la Bronquitis infecciosa Aviar.**

### 2.3.3 Agente etiológico

Clasificación:

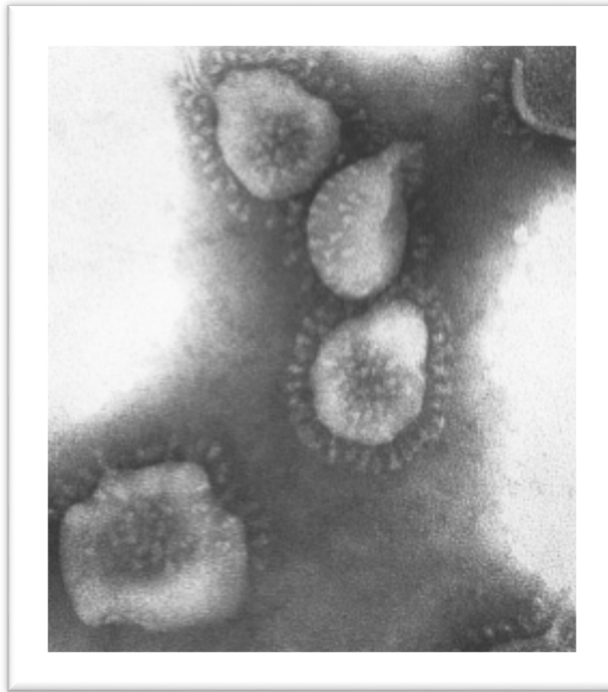
Orden: Nidovirales

Familia: Coronaviridae

Sub Familia: Coronavirinae

Género: *Gammacoronavirus*

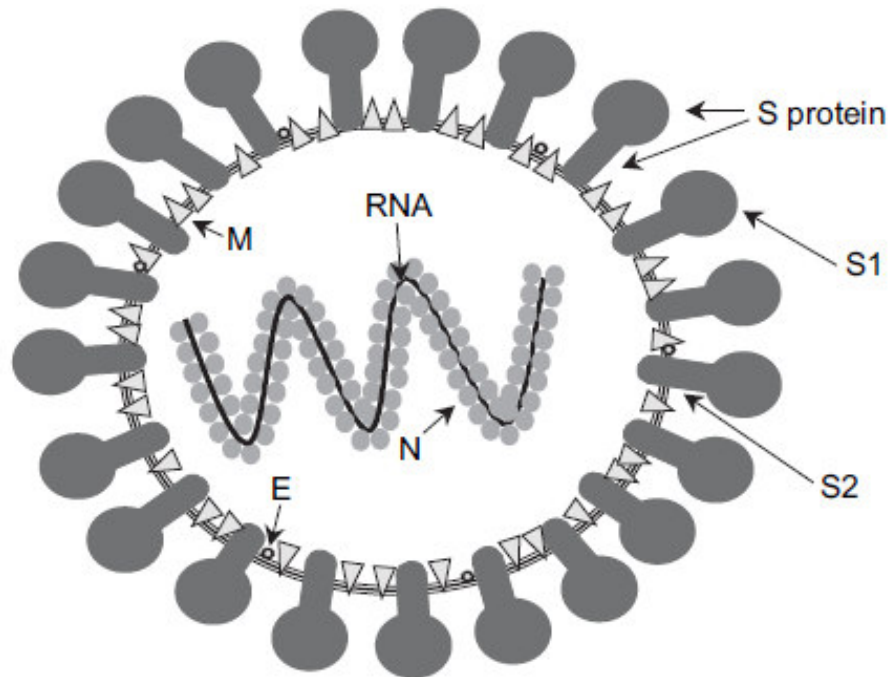
El vBIA es una gammacoronavirus y su nomenclatura se debe a las proyecciones en forma de pedúnculos que envuelven la envoltura del virión, que le dan un aspecto de “corona solar”, conocidas como peplómeros o espículas de 20 nm de largo (Figura 2). Mediante la microscopía electrónica (ME), se observa que este virus tiende a ser circular a pesar de que el pleomorfismo es una de sus características importantes. Tiene un diámetro que varía de 60-200 nm incluyendo las espículas, (Cubillos, 1991). Su genoma es un ARN lineal simple de polaridad positiva y de 27,6 Kb de longitud (Gonzalez *et al.*, 2003). Es moderadamente lábil, sensible a desinfectantes y a la desecación (Cavanagh y Gelb, 2008).



**Figura 2. Virus de la Bronquitis infecciosa Aviar. (Tomada de Berry y Almeida en Diseases of Poultry, 2008).**

#### **2.3.3.1. Estructura y composición**

El vBIA está constituido de tres proteínas estructurales: la proteína de la nucleocápside (N) la proteína de la membrana (M) y la proteína de las proyecciones de la superficie (S) (Jackwood & De Wit 2013; Avellaneda, 1992). Adicionalmente, existen cantidades pequeñas de una cuarta proteína (proteína de membrana pequeña, denominada (E), la cual es importante para el acoplamiento del virus (Lai, 1997; Cavanagh y Gelb, 2008). (Figura 3).



**Figura 3. Representación esquemática del virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar. (Tomada de Cavanagh 2007).**

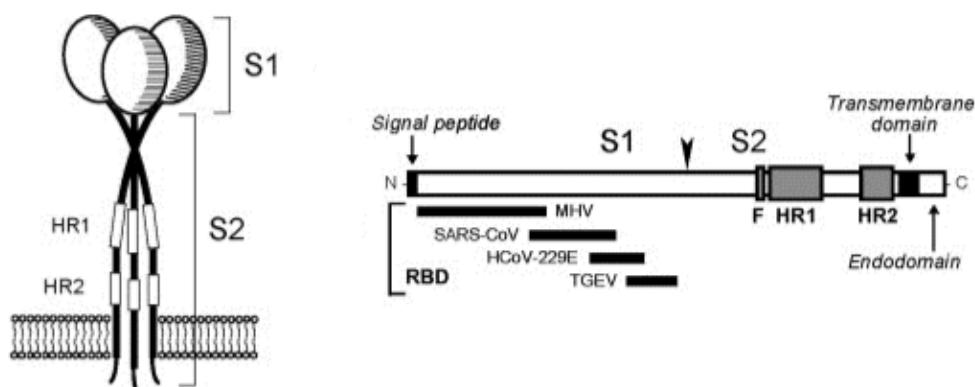
M, proteína de la membrana, S proteína de la espícula, N, proteína de la nucleocapside, E proteína de la envoltura

#### **a. Proteína de la espiga**

Conocida también como proteína de la superficie (S) y presenta la forma de espiga (ingles spike). La forma característica que presentan los coronavirus se debe a las proyecciones de la proteína S las que pueden ser apreciadas mediante la microscopia electrónica. Esta proteína presenta 1160 aminoácidos (aa) y está constituida de dos subunidades: la subunidad S1, de 520 aa y la subunidad S2 de 625 aa (Cavanagh y Gelb, 2008). La proteína S2 se une a la proteína de membrana a través de la proteína S2 que tiene la forma espiga y actúa como ancla. La variabilidad del virus y la inducción de anticuerpos protectivos son conferidas por la S1. Por ello pruebas moleculares que se basan en la identificación de los diferentes vBIA se realizan a través de la proteína S1.

La proteína S1 durante la infección, permite el ingreso del virus, y es causante de la determinación del tipo antigénico viral y de la inmunidad induciendo la creación de anticuerpos hemaglutinantes/neutralizantes son específicos para cada serotipo, ocurriendo la mayor transformación antigénica en esta porción (Villegas, 2011). La proteína S2 contiene epítopes produciendo reacciones cruzadas en diferentes pruebas serológicas (Escorcia, 1999).

Los modelos estructurales indican que tres moléculas de S forman las espículas. Los dominios S1 constituyen los bulbos de la espícula, mientras que los dominios S2 forman un tallo espiralado mediante la interacción de las regiones HR (heptad repeat). Las regiones HR son repetidos de siete aminoácidos, ampliamente distribuidas en las proteínas de fusión virales, que median la interacción entre proteínas (Figura 4)



**Figura 4.** Izquierda: modelo del homotrímero de la proteína S. Derecha: mapa lineal de la proteína S en donde se muestra la porción amino terminal S1 y carboxilo terminal S2. La punta de flecha indica el sitio de clivaje S1-S2. En S1 se indica el péptido señal y los dominios de unión al receptor. En S2 se indica las regiones HR (HR1 y HR2), el péptido de fusión (F), el dominio transmembrana y un endodominio. (Tomado de Masters, 2006).

#### **b. Proteína de la membrana**

Conocida como glicoproteína M con 225 aminoácidos, es altamente hidrofóbica y variable (Lai y Cavanagh 1997). Solamente el 10 % se encuentra expuesta en la superficie de la membrana exterior, porque la mayor porción de esta proteína está dentro de la membrana interior (Jackwood & De Wit 2013). El extremo carboxilo de esta proteína se proyecta al interior del virión e interactúa con el ARN viral, mientras que el extremo amino terminal está expuesto al exterior de la envoltura del virión (Armstrong et al., 1984). Constituye parte de la proteína de la nucleocápside porque se encuentra ligada la proteína N, al igual que con la proteína de la envoltura (Lai, 1997). La proteína M en las células infectadas es importante en la maduración del virus y la determinación del sitio de acoplamiento del virus (You *et al.*, 2007)

#### **c. Proteína de la nucleocápside**

La proteína N es parcialmente estable a diferencia y se encuentra asociada al genoma del virus (Avellaneda, 1992). Esta fosfoproteína de 50-60 KDa participa en la replicación del ARN viral, interactuando con las proteínas M y E, en el ensamblaje del virus y en la inmunidad a la infección (Lai, 1997, Cavanagh y Gelb, 2008).

#### **d. Proteína de la envoltura**

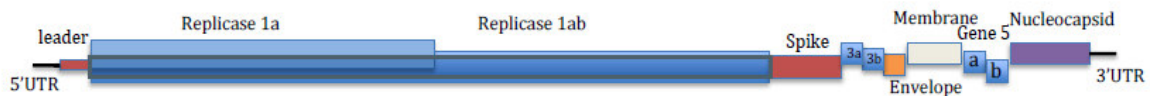
Es una pequeña proteína integral de la membrana conocida como proteína E de 108 aminoácidos e interviene en el ensamblaje del virus (González, 2003). La mutación en esta proteína ejerce una capacidad de ensamblaje negativo del virus a las células (Fischer, 1998).

El vBIA presenta en ambos extremos del genoma regiones no traducidas denominadas 5' UTR y 3' UTR. Los UTRs poseen importantes funciones en la regulación de la replicación y transcripción del genoma viral. Igual que el resto de los coronavirus, el vBIA contiene un set de genes esenciales, que codifican para las proteínas estructurales y las proteínas asociadas a la replicación y transcripción viral, que se encuentran en un orden invariable en todos los miembros de la familia Coronaviridae (Lai *et al.*, 1997). El vBIA tiene un grupo de genes accesorios, que lo diferencian entre los diferentes coronavirus, y codifican para pequeñas proteínas no estructurales de función desconocida (3a, 3b, 5a y 5b) (Weiss y Navas, 2005).

### 2.3.3.2 Replicación viral

En las células epiteliales del tracto respiratorio se produce la replicación del vBIA. En el citoplasma se generan seis ARN mensajeros producto de la transcripción discontinua la misma, que puede ocasionar varias recombinaciones. A través de un proceso en las membranas del retículo endoplasmático y mediante la gemación se forma el virón. Las proteínas S, E y M se insertan a la membrana de Golgi y la proteína N se une al nuevo genoma viral para formar la nucleocápside. Los viriones se acumulan en la superficie de las vesículas lisas de retículo endoplasmático, y los mecanismos de liberación de la célula son desconocido. Posterior a las 3 horas de la infección celular, los nuevos virus empiezan a presentarse (Jackwood & De Wit 2013).

El complejo de replicación/transcripción (RTC) sintetiza nuevos ARNs genómicos virales, así como ARNm subgenómicos a partir de los cuales se traducen el resto de las proteínas virales. Los procesos de replicación y transcripción requieren de distintos tipos de secuencias reguladoras distribuidas en el genoma de vBIA (Figura 5).



**Figura 5. Representación esquemática del genoma del vBIA.**

El genoma del vBIA contiene seis genes, tres de los cuales poseen más de un marco abierto de lectura. El gen 1 codifica para proteínas asociadas a la transcripción y replicación de los genes virales. El gen 2 codifica para la Glicoproteína de Superficie. El gen 3 codifica para proteínas no estructurales (ORFs 3a y 3b) y para la pequeña proteína de membrana (ORF 3c). El gen 4 codifica para la glicoproteína integral de membrana. El gen 5 codifica para proteínas no estructurales. El gen 6 codifica para la Proteína de Nucleocápside. Ammayappan *et al.*, (2008).



### **2.3.3.3 Variación antigénica**

El vBIA se caracteriza por su gran variabilidad antigénica (Malo, 1994), la que se produce a través de dos diferentes mecanismos: mutación y recombinación. La primera ocurre más frecuentemente (Cook, 1999), pudiendo surgir un nuevo serotipo producto un cambio en la estructura de una aa. Durante la replicación viral, la recombinación se materializa en la cadena positiva de ARN, esta se da cuándo existen dos partículas del vBIA a través de un mecanismo de transcripción discontinua (Cook, 1995). Los estudios genéticos en los coronavirus mencionan que se producen las recombinaciones debido a los cruces que ocurren en lugares homólogos o equivalentes donde están ARNs similares (Escorcia, 1999). Varias investigaciones demuestran que región principal en donde se realiza la variación antigénica es la subunidad S1 del vBIA, posiblemente producto de recombinación genética en regiones claves hipervariables, las que se localizan cerca al N- terminal de la proteína S1 (Cook, 1995). Los gammacoronavirus necesitan evolucionar y lo hacen a través de la recombinación genética, existiendo factores que favorecen esta condición como, es el uso de más de una cepa vacunal atenuada en campo. (Cook, 2002; Escorcia, 1999).

Las variantes genéticas del vBIA existen a nivel mundial, además de variantes ubicuas consignadas a determinadas áreas geográficas. Algunas de las variantes se diseminan rápidamente y esto aún es desconocido (De Wit & van der Heijden 2011).

Cuando el vBIA se encuentra replicándose, la presión selectiva producida por el huésped tiene una gran influencia sobre la población viral y esto ocurre porque el vBIA sufre variación genética durante la invasión al mismo (Cavanagh *et al.*, 2007, Jakwood 2012).

### **2.3.3.4 Protectotipo y genotipo del virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar**

Después de la confirmación de que la BIA no era causada por un solo serotipo viral, se propuso una manera de clasificarlos la cual establece dos formas. (De Wit 2000):

**Protectotipo:** Conocido también como Inmunotipo ya las pruebas que se usan para determinar estas características son funcionales es decir que consideran el efecto biológico del virus. Proporcionan información sobre la eficacia de las vacunas, y cómo las cepas inducen protección contra otra cepa.

El protectotipo se analiza con la medición de la actividad ciliar de las células del epitelio traquea (Cook, 1999).

El genotipo: Agrupa a las cepas basándose en la caracterización de una parte del genoma. Esta información sirve para los estudios epidemiológicos.

#### **2.3.3.5 Serotipos del virus de Bronquitis Infecciosa**

Últimamente los serotipos y genotipos están siendo clasificados basados en las secuenciaciones de la proteína S. La nomenclatura de las cepas del vBIA es identificada de la siguiente manera: BIA/tipo de ave/ país de origen/genotipo o serotipo/ designación de cepa/ año de aislamiento. (Jackwood & De Wit 2013).

El primer serotipo existente del vBIA fue el serotipo Massachusetts, seguido por el serotipo Connecticut. Estos dos serotipos son los principalmente incluidos en la preparación de las vacunas comerciales de mayor uso en la industria y son utilizados como patrones al momento de comparar e identificar cepas emergentes del virus. Desde entonces se han detectado muchos serotipos del vBIA: Holte, Gray, Arkansas, (Cook, 1999). Delaware, Georgia, D207, Italian 02, Qx, etc (De Wit *et al.*, 2011).

Las cepas H52 y H12 pertenecientes al serotipo Massachusetts fueron reportadas en Holanda durante la década del 70, presentan ciertas diferencias con la cepa original y son usadas en la vacunación de las aves. Igualmente, en Holanda se han reportado otras cepas como: D3896, D3128, D1466, D274, D212, D207; estas cepas fueron designadas con la letra D (iniciales que proceden del laboratorio de Doorn) (Villegas, 2000)

#### **2.3.4 Patogenia**

La BIA es principalmente una enfermedad primaria que afecta a pollos y gallinas, la patogenicidad del virus está influenciada por la edad del ave, las condiciones medioambientales y de manejo (Meulemans *et al.*, 2001) así como por el tropismo de la cepa (Gonzalez, 2003). El lugar principal de replicación viral es el tracto respiratorio alto y a través de la inhalación de aerosoles contaminados con excreciones de aves infectadas el virus se transmite rápidamente en las aves (Dhinakar y Jones, 1997).

El vBIA presenta tropismo por las células epiteliales y se replica en el tracto respiratorio superior, en las células ciliadas y células secretoras de mucus, por lo que las aves presentan exudado catarral en pasajes nasales y tráquea (Cubillos 1991). Los signos clínicos aparecen de 20 a 48 horas posteriores al inicio del proceso haciendo que la diseminación de la enfermedad sea muy rápida, (Whiteman, 1983). El virus se replica en tráquea, pulmón, sacos aéreos, los cornetes nasales, glándula de harder, produciendo lesiones en la mucosa de estos epitelios. El virus también puede replicarse en riñones, oviducto y tracto intestinal, porque se propaga velozmente (Cavanagh & Naqi, 2003). Luego de la infección, las aves eliminan el agente vía aerosol por 4 semanas, y por vía fecal pueden eliminarlo por más tiempo (Cook, 1991; Cavanagh & Naqi, 2003).

El daño en la tráquea empieza con una ciliostasis que puede destruir el epitelio traqueal y posteriormente se puede recuperar. Los riñones de las aves jóvenes pueden tener cristales de ácido úrico y la infección renal se caracterizan por un incremento palidez y volumen de los túbulos y uréteres, (Whiteman, 1989).

El daño permanente de los oviductos se produce en las aves de larga vida (Cavanagh & Naqi, 2003). Los oviductos pueden estar quísticos o hipoplásicos , conteniendo folículos reventados o flácidos (Whiteman, 1989). Chu (1975), reportó que luego de la multiplicación en tráquea del *Mycoplasma gallisepticum* en aquellas aves que previamente o simultáneamente habían sido infectadas con el vBIA, los signos clínicos fueron severos. La inoculación vía intranasal de cepas del vBIA y *Escherichia coli*, produjeron elevada mortalidad sobre las aves de temprana edad; este resultado no se produce cuando solo se inculca los agentes infecciosos por separado, y la mortalidad varió entre el 14 y 82% con diferentes cepas del vBIA (Cavanagh & Naqi (2003). En un ensayo experimental el uso de la combinación de vBIA y *Escherichia coli*, produjo la ascitis en pollos comerciales; adicionalmente las bajas temperaturas que causan estrés en las aves, la presencia de *Mycoplasma synoviae*, más la exposición al vBIA produjeron aerosaculitis de variable incidencia y severidad dependiendo de la cepa del virus.

La infección con el vBIA, incrementa la susceptibilidad del ave a agentes secundarios como *Escherichia coli*, *Mycoplasmas* y *Haemophilus paragallinarum*, causando daño sustancial

especialmente en pollos de carne donde es posible tener alta mortalidad (Cavanagh & Naqi, 2003).

La afinidad de cepas virulentas del vBIA por otros órganos como es el tracto digestivo es menor. Sin embargo, se han reportado brotes de cepas que son “tipo proventricular” como las cepas QX y Q1, que pueden producir una alta mortalidad en las aves. (Yu *et al.*, 2001).

Las aves infectadas con el vBIA pueden ser transportadoras y diseminadoras de la enfermedad durante las cuatro semanas, que se encuentren infectadas (Cook 1999).

### **2.3.5 Transmisión**

La BIA es altamente contagiosa en forma horizontal, el periodo de incubación es corto pero su diseminación muy rápida entre las aves. La transmisión vertical no se da. La infección se puede dar por inhalación o ingestión de las partículas virales, por el contacto directo con aves afectadas, o de manera indirecta a través de aerosoles, heces, o fómites (Cook, 2002).

La mayor concentración de virus se detecta en la tráquea durante los primeros 3 a 5 días posterior a la infección. Como el virus es excretado por las heces y orina durante estadios crónicos de la enfermedad, el virus puede ser detectado en las tonsilas cecales o mediante hisopados de cloaca (Cavanagh & Naqi, 2003).

### **2.3.6 Susceptibilidad a agentes físicos y químicos**

Los coronavirus son altamente susceptibles al calor y pueden ser inactivados a 60°C por 30 minutos (Rabenahu *et al.*, 2005). Para que pueda ser preservado durante un largo periodo, el virus debe ser congelado a -80° C. El virus puede sobrevivir hasta 12 días en primavera y 56 días en ambientes muy fríos. Los fluidos alantoideos liofilizados con vBIA, deben permanecer refrigerados, el pH debe mantenerse entre 6 y 8 durante el cultivo celular en laboratorio (Cook, 1991, Dhinakar y Jones, 1997)

El vBIA es muy susceptible a agentes químicos como cloroformo y desoxicolato de sodio. La mayoría de desinfectantes usados en la industria avícola inactivan al virus, pero estos deben ser usados en combinación (Jackwood & de Wit 2013)

### **2.3.7 Signos clínicos**

Los signos clínicos que ocasiona el vBIA varían dependiendo de muchos factores como: el tipo de cepa, sexo y edad del ave, estado inmunológico, co-infección con otros agentes, medio ambiente (polvo, clima, amoníaco) y estrés (Jackwood & De Wit 2013).

Los signos clínicos respiratorios se observan comúnmente en pollos de engorde e incluyen estornudos, tos, estertores húmedos y descarga nasal (Gelb y Jackwood 1998); ocasionalmente algunas aves pueden estar deprimidos y se agrupan alrededor de los sitios con calor, además pueden tener los senos paranasales inflamados, Las cepas que ocasionan signos respiratorios en pollos son consideradas las más importantes, siendo estos signos más severos en las aves jóvenes (Villegas, 2000). El virus causa una infección respiratoria moderada y pasajera, resultando en alta morbilidad y mortalidad variable (Cook, 1998). La ganancia de peso y el consumo de alimento disminuyen. La enfermedad puede pasar desapercibida en aves con más de 6 semanas de edad, en donde los signos clínicos son similares, pero con descarga nasal poco frecuente (Gelb y Jackwood, 1998), pero al ser examinados nocturnamente se puede conocer si la enfermedad es severa a través de los sonidos ocasionados por los ronquidos. En EE. UU y el Reino Unido, durante años 90, algunas de las cepas de campo del vBIA produjeron aerosaculitis, severa hinchazón facial, y variada mortalidad. Las aves presentaron debilidad, depresión y aglomeración alrededor de la fuente de calor; la mortalidad en pollitos es generalmente insignificante, excepto cuando la enfermedad se complica con otros agentes infecciosos (Whiteman, 1983).

Los pollos afectados con cepas nefropatógenas, se recuperan de los signos respiratorios y luego presentan depresión, plumas erizadas, aumento de la ingestión de agua y mortalidad. Las dietas ricas en proteínas son un factor que predispone a las aves afectadas con cepas nefropatógenas a presentar signos clínicos durante la infección (Gelb y Jackwood, 1998),

El aumento en la incidencia de huevos de baja calidad y reducción en el número hasta un 70% se producen en la aves ponedoras y reproductoras con infecciones por BIA, en donde la albumina se vuelve acuosa; y de acuerdo al serotipo viral y edad del ave, la caída en la producción puede ser variable (Comotto, 2000, Cook, 1999; Kinde, 1991). La coinfección

con *Mycoplasma synoviae* aumenta el porcentaje de huevos con anormalidades en la cascara (Cook, 1991, Dhinakar y Jones, 1997).

Los pollos de engorde infectados con cepas nefrotrópicas, presentan síntomas respiratorios leve. El inicio de los signos clínicos en las aves se da con la fase respiratoria, seguidos de la depresión, aumento del consumo de agua, erizamiento de plumas, excretas fluidas, daño renal y finalizando con la muerte. Los signos declinan en una semana y generan un rápido aumento de la mortalidad causando pérdidas del 5 al 25% en los siguientes 10 días o más; a la necropsia se observan riñones afectados, de color pálido, hinchado y moteado, además de uratosis renal y visceral (Meuleman *et al.*, 1998); también pueden ocasionar hinchazón de la cabeza (Dhillon, 1989). Se puede producir el aumento de la mortalidad en aves ponedoras cuando la urolitiasis está asociada a BIA.

Factores como estrés causado por las bajas temperaturas, deficiente ventilación, mala alimentación y la presencia de microorganismos que causan infecciones, exacerban los signos clínicos (Cavanagh & Naqi, 2003). El estado inmune de las aves que son vacunadas contra la BIA hace que la expresión clínica de la enfermedad sea muy variable y esto se puede reflejar cuando los brotes son muy severos (Bickford, 1995).

### **2.3.8. Lesiones**

#### **2.3.8.1. Macroscópicas**

Los pollos infectados con el vBIA presentan exudados serosos, catarrales o caseosos en senos paranasales y nasales, así como en la tráquea; los sacos aéreos contienen un exudado amarillento gaseoso y pueden ser opacos. Las aves necropsiadas tienen tapones caseosos en los bronquios o en la parte inferior de la tráquea, los riñones son edematosos y pálidos y presentan aerosaculitis. Las aves de larga vida pueden tener restos de yema en la cavidad abdominal (Cavanagh & Naqi, 2003). El peso y tamaño de los oviductos se encuentran reducidos. (Gelb y Jackwood, 1998).

### **2.3.8.2. Microscópicas**

Dentro de las 18 horas de la infección, la tráquea y bronquios muestran pérdida de cilios con hiperplasia y metaplasia epitelial. En la lámina propia existe la infiltración de monocitos y linfocitos (Cook, 2008) y la mucosa de la tráquea se torna edematosa.

En la tráquea, las lesiones microscópicas se encuentran en tres estados: hiperplásico, regenerativo y degenerativo. Durante los dos primeros días pos infección en el estado degenerativo se produce la descamación y descialiación de las células epiteliales y mucosecretoras; y en la lámina propia ocurre una suave propia infiltración de linfocitos y heterófilos, donde la heterofilia se encuentra algunas veces entre el lumen de la tráquea y frecuentemente se infiltran e entre células epiteliales ciliadas. Las nuevas células epiteliales formadas generalmente son no ciliadas en el estado de hiperplasia. La regeneración completa puede durar hasta el día veinte iniciándose el mismo entre el cuarto y sexto día pos infección. La descamación de células epiteliales, exudado fibrinoso y edema pueden ser observados los sacos aéreos infectados (Dhinakar y Jones, 1997). La descamación del epitelio tubular es causada por cepas nefrotóxicas causando vacuolización e infiltración de heterófilos. La atrofia de ciertas zonas del riñón, con uratosis pueden producir la muerte debido a los cambios degenerativos persistentes (Dhinakar y *et al.*, 1997). Las gallinas infectadas contienen el oviducto sin de cilios, o con disminución en la altura de los mismos; así como infiltración de linfocitos, edema epitelial, células plasmáticas, heterófilo, y dilatación de las glándulas tubulares (Cavanagh & Naqi, 2003).

### **2.3.9 Respuesta inmune**

#### **2.3.9.1. Inmunidad innata**

La inmunidad innata se encuentra asociada a varios elementos conocidos como barreras naturales: mucosa, membranas, piel, complementos, lisosomas, células asesinas (NK) proteínas de fase aguda, granulocitos y macrófagos que confieren al ave la protección ante la invasión de agentes externos. La primera línea de defensa contra el agente infeccioso son los heterófilos, produciéndose inmediatamente después de la infección, desencadenando una

respuesta inflamatoria, siendo las células más numerosas en una inflamación temprana en las aves infectadas (Dhinakar y Jones, 1997).

La transcripción diferenciada de genes de la respuesta innata: TLR 3, TLR 7, IL 1 $\beta$  e INF - $\beta$ , comienza posterior a la infección del epitelio traqueal, luego se produce el reclutamiento de macrófagos y la disminución en la expresión de estos genes implica una aglomeración de los virus en el tejido epitelial. (Kameka *et al.*, 2014)

#### **2.3.9.2. Inmunidad adquirida**

La presencia de macrófagos, células T (inmunidad celular), células B (inmunidad humoral), y la producción de células de memoria se activan como mecanismos de los antígenos específicos. En los órganos linfoides secundarios ocurre la reacción inmune para antígenos extraños y esto se produce cuando los patógenos son inhalados, siendo las células del tracto respiratorio las primeras células inmunes en exponerse. Las células inmunes ubicadas en los órganos linfoides secundarios son estimuladas provocando una respuesta inmune sistémica cuando los antígenos no pueden ser controlados por los mecanismos de defensa local (Sharma, 1994).

Los anticuerpos específicos contra el vBIA se producen a partir de la viremia producida en tráquea hacia otros órganos. Inmediatamente después de la infección las inmunoglobulinas M (IgM), están de forma transitoria y posteriormente aumenta la concentración de las inmunoglobulinas G (IgG), y son las proteínas de mayor circulación.

Cuando se incrementan los niveles de IgG, la concentración de IgM declina drásticamente, así las primeras pueden ser detectadas desde el cuarto día hasta veintiún días posterior a la infección, y pueden mantenerse a altas concentraciones durante varias semanas, dependiendo de la cepa viral (Jackwood 2012). La diseminación de la viremia de la tráquea a los riñones y oviductos se previenen con los anticuerpos neutralizantes específicos para el vBIA (Raj y Jones 1997), los anticuerpos maternos brindan una protección por un corto periodo de tiempo contra BIA (Cook *et al.*, 1991) sin afectar la eficiencia de las vacunas que fueron administradas al primer día de edad.



### **2.3.9.3 Inmunidad local**

La inmunidad local producida en el tracto respiratorio, tiene una trascendencia relevante en la protección contra la enfermedad. En la glándula harderiana se produce una gran población de células plasmáticas dependientes de la edad se producen siendo la fuente de inmunoglobulinas en los fluidos lacrimales. Cuando esta glándula es estimulada por vacunas administradas vía ocular, tiene un rol preponderante en el aumento de la inmunidad mucosal (Davelaar y Kouwenhoven, 1981). Estos autores demostraron que, en los pollos vacunados vía ocular al primer día de edad, la protección se generaba primordialmente en la mucosa nasal- ocular, y que la glándula de harder ocasionaba la reducción en los niveles de protección. Los anticuerpos como la inmunoglobulina A (Ig A) se sintetizan en la glándula harderina y pueden ser detectados en los fluidos lagrimales (Drinakar y Jones, 1999).

### **2.3 9.4 Inmunidad celular**

Los primeros reportes sobre el rol de inmunidad mediada por células fueron realizados por Timms en 1980, demostrando que en las aves infectadas con el vBIA se realizaba la multiplicación de los linfocitos T-antígeno específico. Posteriores estudios emplearon la cepa nefropatogenica Gray para demostrar que la respuesta por el complejo mayor de histocompatibilidad 1 (MHC-1) tenía mayor correlación con la eliminación viral en riñones y pulmones durante la fase aguda de la infección, que la respuesta humoral de IgM e IgG. En algunas aves se ha demostrado una positiva correlación entre la resistencia al desafío y la respuesta linfoproliferativa (Jackwood & De Wit 2013)

La inmunidad local para BIA en la tráquea aparece varios días después de la infección y es mediada por células que involucran al linfocito T citotóxico CD8 (Janse *et al*), y se encuentra asociada a la mejoría de la enfermedad (Jackwood, 2002). El daño en el epitelio traqueal se produce a las 24 - 72 horas posterior a la infección con una proliferación elevada de linfocitos -T- citotóxicos a los diez días post infección, siendo este evento muy tarde en la prevención del daño al tracto respiratorio superior (Jackwood, 2002).

#### **2.3.9.5 Anticuerpos humorales**

Las aves desarrollan una buena respuesta humoral contra la infección del vBIA. La inmunoglobulina G (IgG) es la de mayor circulación, y los anticuerpos son detectados por las pruebas de IH y ELISA. La detección de anticuerpos se da desde los cuatro días post inoculación, alcanzando su acmé a los 21 días, y los títulos altos se pueden mantener por varias semanas. La inmunoglobulina M (IgM), está transitoriamente posterior a la infección, y es detectada mediante la prueba de ELISA en infecciones nuevas. En aves con un desafío secundario se producen anticuerpos específicos producto de la viremia producida desde la tráquea hacia los riñones y oviductos y estos pueden proteger el epitelio traqueal (Dhinakar y Jones, 1997).

Después de producida la infección, en el tracto respiratorio superior del ave se producen los anticuerpos neutralizantes como elementos relevantes en la protección contra la infección, produciéndose una inhibición de la replicación del vBIA por parte del interferón tipo I (Jackwood. 2002).

#### **2.3.9.6 Anticuerpos maternos**

Los anticuerpos maternos son de vida corta producto de la protección contra BIA en las madres reproductoras: Han sido encontrados en lavados traqueales y no poseen resultados desfavorables sobre la efectividad de vacunas vivas suministradas en los primeros días de edad (Dhinakar y Jones, 1997)

#### **2.3.10. Mortalidad y morbilidad**

Todas las aves del lote se ven afectadas luego de la infección con el vBIA, produciéndose una variable mortalidad dependiente de diversos factores como: edad del ave, alimentación, estrés, temperatura, estado inmunitario, infecciones concomitantes y sobre todo del serotipo y su virulencia (Cavanagh & Naqi, 2003). La cepa T australiana que tiene afinidad por el riñón o La cepa Delaware 072 que tiene afinidad por el aparato respiratorio ocasionan una mayor mortalidad (Comotto, 2000). Así como las cepas Qx y Q1 (Liu, *et al.*, 2009). La mortalidad puede ser alta, especialmente cuando los pollos de engorde tienen menos de 6 semanas de edad e insignificante en aves adultas. La mortalidad por urolitiasis varía entre el 0.5% y 1.0 % semanalmente. Los datos productivos como; conversión alimenticia y ganancia

de peso se encuentran perjudicialmente comprometidos. La presencia *Escherichia coli* u otras bacterias oportunistas ayudan a empeorar el pronóstico, evolución y el corolario de la enfermedad, (Comotto, 2000).

#### **2.3.11. Diagnóstico**

El diagnóstico de la BIA es basado en los signos clínicos, lesiones, seroconversión, detección de antígeno, detección de anticuerpos, aislamiento viral o detección del ARN viral.

##### **2.3.11.1 Aislamiento e identificación**

El aislamiento se puede realizar en huevos embrionados de 9 a 11 días de edad como primer intento de aislamiento (Gelb, 1990), utilizando hisopados traqueales desde los 3 a 5 días post infección. También se pueden utilizar las tonsilas cecales ya que el virus persiste por mucho más tiempo en ellas (Villegas 2000) Adicionalmente se pueden tomar muestras de pulmón, riñón y oviducto, dependiendo de la historia clínica del lote.

La ruta de inoculación más adecuada es vía saco alantoideo. Los signos de replicación del virus son enanismo y encurvamiento del embrión, sin embargo, se debe confirmar la presencia del virus por Virus neutralización (VN), Inhibición de la hemaglutinación, inmunofluorescencia, RT-PCR o microscopia electrónica. (Jackwood & De Wit 2013)

##### **2.3.11.2 Serología**

La detección de anticuerpos contra el vBIA se hace por medio de las pruebas serológicas de ELISA o inhibición de la hemaglutinación (HI).

Dado su mayor sensibilidad, la prueba de ELISA es la más usada en el mundo para la detección de anticuerpos (principalmente Ig G) debido a que es fácil de usar y de tiene costo (Gelb y Jackwood, 1998). La prueba de ELISA por un periodo más prolongado puede detectar la presencia de anticuerpos (Canovas *et al.*, 1990). Existen muchos kits comerciales, que facilitan la detección de anticuerpos en corto tiempo, lamentablemente mediante la prueba de ELISA no se pueden diferenciar los serotipos del vBIA (Jackwood & De Wit 2013)

Para determinar los serotipos de vBIA presentes en el suero, se pueden realizar por la prueba de la inhibición de la hemaglutinación (IH) o por la prueba de virus de neutralización (V.N),

siendo esta ultima la mejor en la serotipificación del virus donde se usan huevos embrionados; o un sistema de cultivo celular traqueal; sin embargo, la prueba demora varios días y es onerosa (Cook, 1999; Malo, 1994), pero tiene la ventaja de ser muy específica (De Wit, 2000).

En la inhibición de la hemaglutinación (IH) se requiere una prueba serológica con cada serotipo viral que se va a investigar, los antígenos que se necesitan para la prueba están disponibles comercialmente (Hatcher, 1983; Smith, 1998). Permite diferenciar serotipos, pero requiere de gran cuidado para realizarla, cuando las aves muestreadas han sido revacunadas o han tenido varios retos con cepas de campo puede dar reacciones cruzadas (Cook, 1999). Esta prueba tiene una menor especificidad frente a la prueba de VN y entre una y dos semanas post infección se pueden detectar los anticuerpos (De Wit, 2000).

La prueba de precipitación en agar (AGP) no se usa ampliamente porque es una prueba poco sensible que detecta alta concentración de precipitinas, además que las precipitinas solo están presentes posterior a la infección por pocos días y la detección de anticuerpos por esta prueba indicaría la exposición temprana al vBIA (Cook, 1999).

El uso de anticuerpos monoclonales, está dirigido hacia las estructuras antigénicas características de cada serotipo, también existen anticuerpos monoclonales de grupo que se utilizan para la detección del BIA, en tejidos infectados utilizando una prueba de inmunoperoxidasa o en el líquido coriolantoideo de embriones inoculados con material sospechoso. (Naqi, 2003).

#### **2.3.11.3 Pruebas moleculares**

El uso de técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa/transcriptasa reversa, (RT-PCR) es un método rápido y preciso en la identificación de las cepas del virus de bronquitis infecciosa, se amplifica el gen de la proyección S-1, que es la porción variable y que produce la diferencia entre serotipos; en esta prueba se comparan las zonas variables y no variables del gen S-1 del virus de campo con las zonas variables y no variables de un virus conocido (Keeler *et al.*, 1998); se puede determinar el gen S-1 de hisopados traqueales, evitándose el cultivo en huevos embrionados que requiere esperar 7 días para realizar la

lectura final de la prueba , además permite detectar el virus muerto a diferencia de la prueba de neutralización viral (Jackwood *et al.*,1997).

La RT-PCR también permite detectar el virus y se basa en generar copias de ADN de genes del vBIA, usualmente de la porción S1 (Cavanaugh y Naqi, 2003); posteriormente la diferenciación del serotipo se puede realizar la prueba de RFLP (Cook, 1999, Gelb y Jackwood, 1998; Cavanagh & Naqi, 2003). La extracción de ARN se puede realizar directamente de la tráquea, pulmón o de otros tejidos de aves vivas. La detección del virus hasta 14 días post infección hace de esta prueba tenga una alta sensibilidad (Gelb y Jackwood 1998).

#### **2.3.11.4 Otras pruebas diagnósticas**

La evaluación de la motilidad ciliar del epitelio traqueal posterior al contacto con el virus ayuda a medir la patogenicidad del vBIA (Cook, 1999). Otra prueba de ayuda en el diagnóstico es la histopatología porque permite correlacionar el daño que se producen en los cilios (Andrade, 1982).

#### **2.3.12. Vacunas**

En nuestro país, para la prevención de la BIA, solo está permitido el uso de vacunas del tipo Mass. Estas pueden ser vacunas activas a virus vivo o inactivadas.

A través de la modificación de cepas patógenas mediante pasaje seriados en huevo embrionados, se producen las vacunas vivas. El número de pasajes necesario para la atenuación del virus difiere debido a cambios genéticos o la patogenicidad de la cepa (Cavanagh, 2004).

Todos los tipos de explotación avícola pueden ser vacunados las vacunas basadas en virus vivos, sin embargo, las vacunas inactivadas se usan en las aves de larga vida, donde se necesita aumentar la inmunidad que se transfiere a su progenie en forma pasiva. Las vías de vacunación suelen ser: por vía ocular, nasal, por aspersión, siendo la primera la vía que produce en la respuesta inmune, una mejor uniformidad. Las vacunas inactivadas se aplican

por vía parenteral. La vacunación en planta de incubación se realiza mediante la gota gruesa o por aspersión (Malo, 1994).

#### **2.3.12.1. Reacciones post vacunales**

Frecuentemente, el problema patológico relevante encontrado en la producción de pollos de engorde es la reacción vacunal respiratoria; convirtiéndose frecuentemente como puerta de entrada de otros microorganismos, causante de lesiones y en varios corresponsables de niveles altos.

Para disminuir las reacciones post vacunales en los pollos de engorde se diseñan planes de vacunación al primer día de edad. En otros casos se usan cepas menos reactivas (Mass-48 o H120) (Morales, 1994). La disminución de las reacciones post vacunales se pueden disminuir drásticamente al seleccionar adecuadamente la cepa vacunal a administrar, así como su vía de aplicación (Villegas, 2000).

#### **2.3.13. Prevención y control**

La identificación de los serotipos prevalentes en una región, es la base fundamental en la prevención y control de la BIA, así como la elaboración de programas de vacunación acertados, espectro de protección cruzada de las vacunas disponibles, y adicionalmente del control de otros factores inmunodepresores y buenas prácticas de manejo (Quiroz, 1999).

Generalmente en el campo se crían pollos de diferentes edades generándose eventos de rotatividad viral y posible “rolling reaction” haciendo más difícil controlar la reacción post vacunal y la enfermedad. Por ello la prevención se realiza con el manejo de repoblación de aves de un día de edad estricto aislamiento seguido por la desinfección y limpieza de galpones (Cavanagh y Naqi, 2003).

En pollos de carne se usan las vacunas vivas y en ponedoras comerciales y reproductoras y se usan tanto vacunas vivas como inactivadas emulsionadas en aceite. Los serotipos de virus presentes en las vacunas han sido generalmente aquellos pertenecientes al serotipo Mass, otras cepas dentro del mismo serotipo son las cepas holandesas H120 y H52 y el serotipo Connecticut que produce menos reacción que la cepa Massachusetts y tiene un espectro

antigénico menor, generalmente se obtienen buenos resultados con vacunas administradas dentro de las dos primeras semanas de edad (Villegas, 1985).

Es importante la detección de cambios en cuanto se presenta la enfermedad en una zona avícola o cuando la severidad aumenta. Antes del control por medio de la vacunación, se tiene que identificar el serotipo prevalente de la zona y determinar la protección cruzada con las vacunas existentes en el mercado. El uso de serotipos no es recomendable si antes no se ha comprobado la existencia del mismo en la zona afectada ya que podría aumentar la posibilidad de recombinaciones genéticas y el surgimiento de nuevas cepas variantes antigénicas del virus en el campo. El vBIA es altamente infecciosa y tiende a propagarse rápidamente haciendo difícil el control de la infección (Odor, 2000).

Con respecto a las nuevas cepas variantes de vBIA, presentes en pollos vacunados, es primordial la identificación de las mismas como un primer paso para controlar la enfermedad; por ello es necesario caracterizar los aislamientos de vBIA variantes y determinar la eficacia de las vacunas actuales o las combinaciones de vacunas comerciales.

Cuando un virus variante se generaliza y las vacunas comerciales no brindan la adecuada protección, se deben desarrollar vacunas específicas. Sin embargo, debe reconocerse que el uso de vacunas vivas atenuadas para un tipo de vBIA no identificado en una región no es recomendado debido a que el virus muta rápidamente y se recombina con otros virus; produciéndose nuevas variantes de campo de vBIA. La identificación de nuevas cepas variantes ha mejorado en los últimos años, pero necesitamos nuevas metodologías de desarrollo de vacunas para responder de manera segura y rápida a los brotes de la enfermedad. (Jackwood 2012).

## **CAPÍTULO III: METODOLOGÍA**

### **3.1 Lugar y tiempo de estudio**

El estudio se realizó con muestras colectadas de pollos de engorde de 3 a 6 semanas de edad que fueron remitidos al Laboratorio de Patología Aviar durante los años 2005 al 2014, todas las aves del estudio presentaban signos respiratorios moderados a severos compatibles con Bronquitis infecciosa aviar.

Los pollos de carne procedían de granjas comerciales ubicadas en diferentes provincias del departamento de Lima. Los datos de procedencia e identificación de las aves fueron consignados en una Ficha de registro (Anexo 1) donde se señala la ubicación de la granja, edad, población, programa vacunal contra BIA, inicio de signos clínicos, así como el porcentaje de animales afectados y demás datos de historia clínica.

La toma de muestra, aislamiento viral, identificación del agente y determinación del serotipo se realizó en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### **3.2. Material**

#### **3.2.1. Material biológico**

Se colectaron muestras de tráquea y tonsilas cecales de 880 pollos de engorde de 3 a 6 semanas de edad, procedentes de 176 granjas ubicadas en las provincias del departamento de Lima, desde el año 2005 al 2014. Las aves presentaron cuadros respiratorios moderados a severos y sospechosos de bronquitis infecciosa.

### **3.3 Métodos**

#### **3.3.1 Toma de muestras**

Las muestras fueron colectadas de aves que presentaban signos compatibles con Bronquitis Infecciosa aviar en el Laboratorio de Patología Aviar de la UNMSM, en donde el caso fue identificado mediante una ficha de registro de datos del lote de aves, procedencia, signos clínicos y hallazgos de necropsia (Anexo 2).



### **3.3.2 Necropsia:**

Los casos remitidos comprendían aves con signos clínicos y en algunos casos aves muertas. Para el presente estudio y con el objetivo de conseguir una buena calidad de muestra para analizar por pruebas moleculares, únicamente se colectaron muestras de aves vivas enfermas, las que fueron sacrificadas, registradas las lesiones macroscópicas y colectadas muestras, inicialmente hasta el año 2010, de pulmón, tráquea y tonsilas cecales. A partir del año 2011 se incluyeron además muestras de riñones. Las muestras fueron guardadas en bolsas plásticas nuevas, herméticamente cerradas y conservadas en congelación a -20°C o -80°C, hasta su procesamiento para el aislamiento viral y análisis molecular.

### **3.3.3 Aislamiento viral:**

Las muestras de pulmón, tráquea, tonsilas cecales y riñones fueron descongeladas, agrupadas para ser analizadas en grupos de 4 a 5 muestras por lote de aves, trituradas en un mortero y centrifugadas a 10000 g/5min. Se colecta sobrenadante y se trata con una la solución antibiótica de penicilina-estreptomicina 150.00 UI (10mg/mL), y se refrigera hasta inocular 0.2 mL de la suspensión. La inoculación se realiza en de pollo de 10 días de edad vía cavidad alantoidea. Los huevos embrionados procedentes de reproductoras comerciales sanas, fueron inoculados e incubados a 37°C, diariamente fue evaluada la viabilidad de los embriones por otoscopia, hasta las 72 horas post inoculación. Los embriones muertos fueron guardados en refrigeración. Tres días post inoculación, los embriones que sobrevivieron fueron sacrificados por enfriamiento a 4°C durante 24 horas, para luego colectar el fluido alantoideo y observar la presencia de lesiones compatibles con bronquitis: enanismo y encurvamiento. Se realizaron dos pasajes ciegos adicionales.

### **3.3.4 Recuperación viral y observación de lesiones:**

El fluido alantoideo del tercer pasaje fue colectado para realizar la extracción del ARN viral y realizar la prueba de RT-PCR en un solo paso (Transcriptasa Reversa - Reacción en cadena por la polimerasa). Se realizó la necropsia de los embriones para verificar las lesiones características que el virus ocasiona en ellos (enanismo y encurvamiento), los mismos que fueron comparados con los embriones controles positivos y negativos.

### **3.3.5 Detección viral por PCR convencional y PCR en tiempo real**

Las muestras colectadas entre los años 2005 y 2010 fueron analizadas por RT-PCR convencional y leídas en geles de agarosa. Las muestras colectadas desde el año 2011 fueron analizadas por PCR en tiempo real.

### **3.3.6 Optimización de RT-PCR-RFLP:**

La implementación y optimización del RT-PCR –RFLP se realizó con una cepa de desafío correspondiente al serotipo Massachussets M41 (título DEL<sub>50</sub> de 10<sup>3</sup> /mL) y tres cepas vivas vacunales: H120 con 10<sup>3</sup> EID<sub>50</sub>, cepa H120 10<sup>3.5</sup> EID<sub>50</sub>, y Mas10<sup>3.5</sup> EID<sub>50</sub>.

Para la prueba de RT-PCR se utilizaron los cebadores usados por Jackwood *et al.*, 1997, siguiendo el protocolo descrito por Lee *et al.*, 2001, a la que se realizaron algunos cambios quedando las cantidades y concentraciones optimas modificadas descritas en las tablas 2 y 3.

### **3.3.7 Extracción de ARN:**

Para la extracción del ARN se usaron 400 µL del fluido alantoideo colectado de los embriones, siguiendo el protocolo indicado por Invitrogen para células animales, se usó un Kit comercial Micro to midi Total ARN purification System, el protocolo de extracción se detalla a continuación:

1. Adición de 2-mercaptoetanol /1 mL de Solución de Lisis para ARN
2. Centrifugación de 200 µL de fluido alantoideo en tubo de 1.5 ml durante 5 min a -4 °C.
3. Eliminación del sobrenadante
4. Adición de la solución de lisis para ARN.
5. Homogenizar la solución durante 2 min en la centrifuga -25° C
6. Adición de etanol 70% (homogenizando continuamente)
7. Filtrar 600 µL del homogenizado cartucho de separación de ARN.
8. Centrifugar por 15 seg/12000 xg/25°C
9. Descartar el sobrenadante
10. Colocar el cartucho de separación de ARN en el Tubo (2mL) de lavado de ARN

11. Agregar 500 µl de Wash Buffer II (conteniendo etanol al 100%)
12. Centrifugar por 15 seg/12000 g/25°C
13. Descartar el sobrenadante
14. Agregar 500 µl de Wash Buffer II (conteniendo etanol-100%)
15. Centrifugar por 15 seg/12000 xg/25°C
16. Descartar el sobrenadante
17. Centrifugar 1 min para secar la membrana
18. Remover el cartucho y colocarlo en el tubo de recolección de ARN
19. Agregar Agua ARNsa
20. Centrifugar por 1min /12000 g/25 para colectar la muestra.
21. Guardar a – 70°C o en hielo por pocas horas.

El extracto de ARN final fue de 25 µL de agua libre de ARNsa tratada con DECP.

### 3.3.8 RT-PCR:

Para la prueba de la Transcriptasa Reversa - Reacción en cadena por la polimerasa (RT-PCR) en un solo paso, se usaron cebadores que fueron seleccionados en la Universidad de Georgia, (USA) siendo idénticos a la región cercana al gen que codifica a la glicoproteína S1, y NM, como se menciona en la tabla 1.

**Tabla 1. Característica de los cebadores usados en la RT-PCR para la detección del vBIA**

Cebador	Secuencia
DEGEN	3'CCA TAA GTA ACA TAA GGR CRA5'
S1 OLIGO	5'TGA AAC TGA ACA AAA GAC3'

La preparación del mix de RT-PCR, se realizó en una cabina de flujo laminar. Las concentraciones de los reactivos se encuentran detalladas en la tabla 2.

**Tabla 2. Concentración de la mezcla de reacción para la RT-PCR en un solo paso**

Reactivo	Volumen ( 1X)
<b>Buffer 5x Titan (10 µL por NM)</b>	8,0 µl
<b>DTT 100 Mm</b>	2,0 µl
<b>1 µL ARNsin (40 U/µL)</b>	1,0 µl
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	4,0 µl
<b>Mezcla de dNTPs (10mM)</b>	1,0 µl
<b>Cebador ( hacia adelante) 50µM</b>	1,0 µl
<b>Cebador (reverso)</b>	1,0 µl
<b>Enzima Mix titan (5U/µL)</b>	1,0 µl
<b>ARN</b>	5 µl
<b>Agua estéril</b>	26 µl

La RT-PCR en un solo paso fue realizado en un termociclador Perkin Elmer-480 y las condiciones se encuentran especificadas en la tabla 3.

**Tabla 3. Ciclos de la a RT-PCR en un solo paso**

Pasos	de Ciclos	Temperatura	Tiempo
<b>Transcripción</b>	1	50°C	60 min
<b>Desnaturalización inicial</b>	1	95°C	5 min
<b>Desnaturalización</b>	35	94°C	30 s
<b>Hibridación</b>	35	55°C	30 s
<b>Extensión</b>	35	68°C	1m
<b>Extensión final</b>	1	68°C	7 min

### **3.3.9 Electroforesis en gel de agarosa.**

Para la visualización de los productos amplificados se realizó la electroforesis en una cámara mini horizontal tipo submarino “Easy Cast”, a un voltaje de 100 V/30 min. Los productos de la amplificación fueron colocados en un gel de agarosa al 1.5 % disuelto en buffer TAE 1X

al que se le añadió 20 µl de bromuro de etidio (0.5µg/mL) por 100 mL de solución. El volumen total cargado en cada pocillo del gel de agarosa fue de 10 µL del producto amplificado más 2 µL de buffer de carga (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol, 0,25% glicerol 35%). Para la visualización de las bandas se utilizó un transiluminador ultravioleta y para la captura de la imagen una cámara polaroid. Se compararon las bandas generadas por el control positivo (cepa serotipo Massachussets M41) de acuerdo al peso molecular (NM 1020pb) y (S1 1720 pb). Las muestras que generaron bandas de igual peso molecular que los controles positivos usados fueron considerados positivas al virus de Bronquitis infecciosa

### **3.3.10 RFLP**

Para la diferenciación del serotipo del vBIA a partir del producto amplificado del segmento S1, las muestras positivas al vBIA fueron digeridas con las enzimas de restricción: *Bst*YI, *Hae*III, y *Xcm*I (New England BioLabs), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un tubo eppendorf de la siguiente manera:

1. 10 µL de DEP agua
2. 3 µL de buffer
3. 15 µL ADN
4. 2 µL Enzima
5. Se incubaron los tubos a 60°C para la Enzima Bsty – I
6. Se incubaron los tubos a 60°C para la Enzima Hae III y Xcm

Posterior a la digestión enzimática, la solución del tubo fue sometida a una muy breve agitación en un vortex, se colectó 15µL de la muestra digerida y se inoculó en un gel de agarosa al 2%, que contenía bromuro de etidio; la corrida electroforética se realizó con 80V/45 min, se visualizaron las bandas en el transiluminador y los productos fueron comparados con los patrones estándares obtenidos para cada serotipo por otros autores.

### **3.3.11 PCR en tiempo Real.**

Las muestras colectadas a partir del año 2011 fueron analizadas por PCR en tiempo real, usando el fluido alantoideo de los huevos embrionados SPF, los embriones mostraron lesiones características de Bronquitis infecciosa como son enanismo y encurvamiento, además estas muestras incluyeron riñones.

Esta metodología permite observar la curva de disociación (temperatura de melting) que se genera con la temperatura que se aplica a una molécula de ADN conocida que se desnaturaliza y emite fluorescencia. A partir de estos datos se obtiene la temperatura de disociación, la cual puede variar debido a la presencia de guanina y citosina, permitiendo identificar y caracterizar la presencia de amplicones. Los cebadores y protocolo descritos por Jackwood *et al.*, 2003 fueron utilizados para esta prueba (Tabla 4).

**Tabla 4. Característica de los cebadores usados en la prueba de PCR en tiempo real para la detección del vBIA**

Cebador	Secuencia
BIALC5'	5'ACT GGC AAT TTT TCA GA3'
BIALC3'	3'ACA GAT TGC TTG CAA CCA C5'

### 3.3.11.1 Transcripción Reversa

Debido a que el genoma del virus de Bronquitis infecciosa es un ARN, se realizó Transcripción Reversa de las muestras de la siguiente manera:

Preparación de mezcla 1:

- Agua 7 µL
- gADN buffer 2 µL
- Muestra de ARN µL
- Se incuba la mezcla a 42°C /2 min e inmediatamente se coloca en hielo.

Preparación de mezcla 2:

- Buffer de transcriptasa reversa 4 µL
- Mezcla de random hexámeros y oligo dT 1 µL
- Transcriptasa reversa 1 µL

Se adicionó 6 µL de la mezcla 2 a la mezcla 1 y se incubó a 42°C /30 min y luego a 95°C/3. El ADN complementario sintetizado se almacenó a -20°C, hasta ser utilizado.

La prueba de PCR en tiempo real se realizó a la concentración descrita en la tabla 5. El PCR en tiempo real fue realizado en un termociclador para tiempo real bajo las siguientes condiciones señaladas en la tabla 6.

**Tabla 5. Concentración de la mezcla de reacción para la RT-PCR en tiempo real**

Reactivo	Volumen ( 1X)
2x Rotor –Gene SYBR	12.5 µl
Cebador ( hacia adelante) (1 µM)	1.0 µl
Cebador (reverso) (1 µM)	1.0 µl
Muestra	2.0 µl
Agua esteril	8.5 µl

**Tabla 6. Programa de PCR en tiempo real**

Pasos	de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Activación (1 ciclo)	1	95°C	5 min
Desnaturalización	40	95°C	5 seg
Hibridación y Síntesis	40	60°C	10 seg

### **3.3.12 Análisis de resultados:**

Los resultados de cada una de las pruebas se expresaron en porcentaje de positivos y negativos.

Se consideraron positivos en cada una de las pruebas en base a las siguientes características:

- **Aislamiento viral:** Número de animales que presentaban: Enanismo y encorvamiento en el desarrollo embrionario
- **RT-PCR:** Por la visualización de productos amplificados en gel de agarosa
- **RFLP:** Por la visualización de productos digeridos por enzimas en gel de agarosa.
- **RT-PCR en tiempo real:** Análisis de la curva de disociación



## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

### 4.1 Necropsia:

En un periodo de 9 años (2005 al 2014), se realizó la necropsia de un total de 880 aves, correspondientes a 176 casos clínicos de pollos con signos clínicos respiratorios compatibles con Bronquitis infecciosa. Un caso fue procedente de una granja comercial, una muestra consistió en 5 aves.

Las aves presentaron variables signos respiratorios y de variable severidad, los que incluyeron depresión, y dificultad respiratoria (Figuras 6, 7). A la necropsia las aves presentaron algunas o todas de las lesiones indicadas en el cuadro 7 y observadas en las Figuras 8, 9, 10 y 11.

**Tabla 7. Número de animales con lesiones respiratorias compatibles con BIA procedentes de 176 granjas del departamento de Lima.**

	<b>Presencia</b>	<b>Ausencia</b>
<b>Celulitis Facial</b>	330	550
<b>Sinusitis</b>	394	486
<b>Aerosaculitis</b>	475	405
<b>Pericarditis</b>	195	685
<b>Perihepatitis</b>	94	786
<b>Traqueitis</b>	449	431
<b>Infiltración de material caseoso en huesos craneales</b>	54	826
<b>Nefritis</b>	16	864



**Figura 6. Aves con depresión**



**Figura 7. Ave con dificultad respiratoria**



**Figura 8. Ave con celulitis del sub cutis**



**Figura 9. Ave con severa congestión nasal**



**Figura 10. Aves con traqueítis moderada**



**Figura 11. Ave con severa aerosaculitis**

#### 4.2 Aislamiento viral:

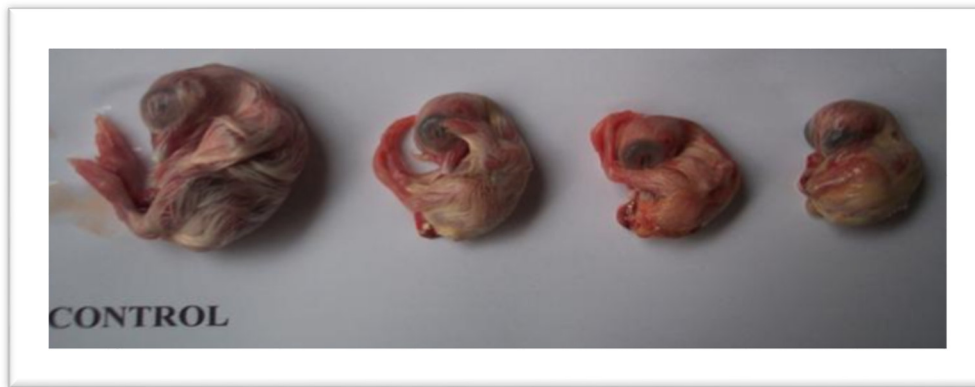
En la tabla 8, se aprecia el número de embriones que presentaban: Enanismo y/o encurvamiento post inoculación de órganos al tercer pasaje hasta el año 2010 y hasta el primer pasaje a partir del año 2011.

**Tabla 8. Número de embriones con signos a VBIA post inoculación de órganos**

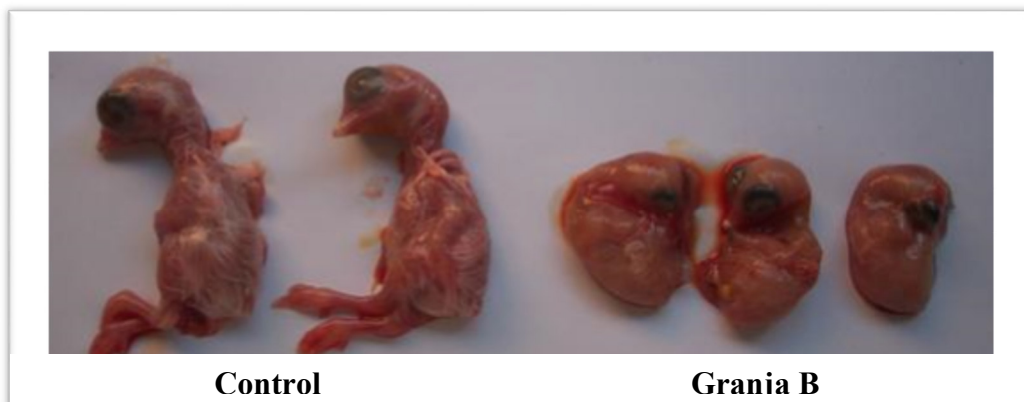
<b>Años Evaluados</b>	<b>Nº de embriones con enanismo</b>	<b>Nº de embriones con encurvamiento</b>	<b>Nº de embriones con enanismo y encurvamiento</b>
<b>2005</b>	122/163	111/163	112/163
<b>2006</b>	88/128	77/128	75/128
<b>2007</b>	201/295	110/295	106/295
<b>2008</b>	30/48	10/48	28/48
<b>2009</b>	28/47	27/47	25/47
<b>2010</b>	26/30	20/30	21/30
<b>2011</b>	18/28	12/28	14/28
<b>2012</b>	17/28	16/28	15/28
<b>2013</b>	26/42	18/42	23/42
<b>2014</b>	51/64	40/64	41/64

Del total de 176 fluidos alantoideos, 92 muestras presentaron lesiones severas en el embrión compatibles con el vBIA.

En la Figura 12 se observan las lesiones inducidas por la cepa de desafío en los embriones inoculados, que sirvieron como controles positivos para el aislamiento viral y cuyo fluido alantoideo fue utilizado en la estandarización de las pruebas moleculares. La Figura 13 corresponde con una muestra de campo positiva al aislamiento viral en huevos embrionados (Granja B).



**Figura 12. Embriones Inoculados con la Cepa de desafío Massachusetts M41**

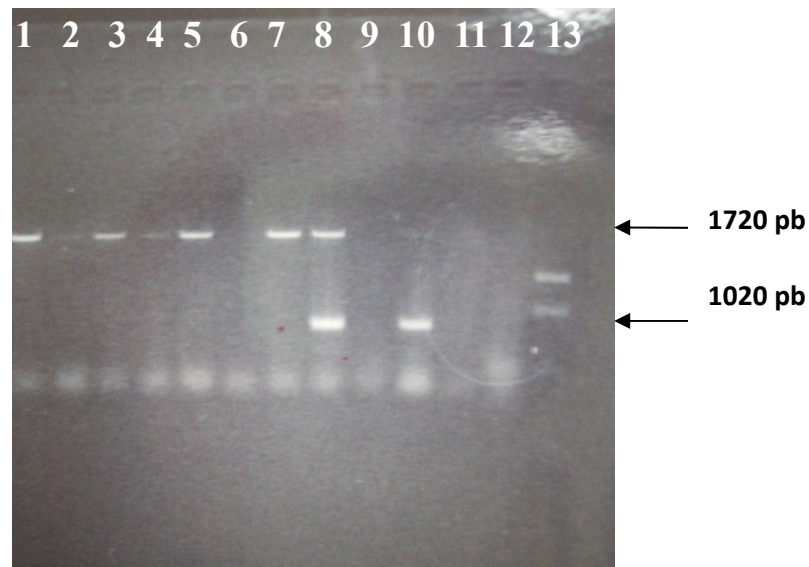


**Figura 13. Granja B. Embriones con enanismo y encorvamiento severo**

#### **4.3. Pruebas Moleculares:**

##### **4.3.1 RT-PCR convencional**

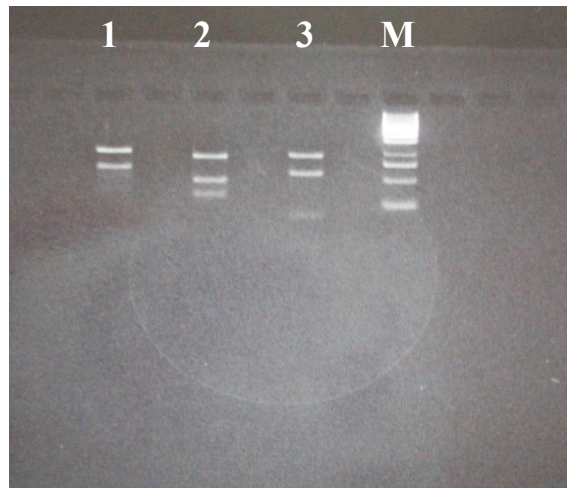
Se procesaron 142 pools de fluido alantoideo mediante a prueba de RT-PCR en un solo paso, obteniéndose 54 muestras positivas al vBIA mediante la prueba de PCR en punto final. Los productos amplificados se pueden observar en la figura 14.



**Figura 14. Resultados de productos amplificados de ADNc de ARN en gel de agarosa al 1.5%. Columna 1 muestra positiva al vBIA de granja 2, Columnas del 2 al 10 corresponden a cepas controles (virus de desafío y vacunales). Columnas 11 y 12 controles negativos.**

#### **4.3.2 RFLP.**

Las 54 muestras positivas al vBIA, mediante la prueba de PCR en punto final fueron digeridas con enzimas de restricción, obteniéndose 50 cepas correspondientes al serotipo Mass, 2 al serotipo Conn y 2 muestras no identificadas. (Figura 15).



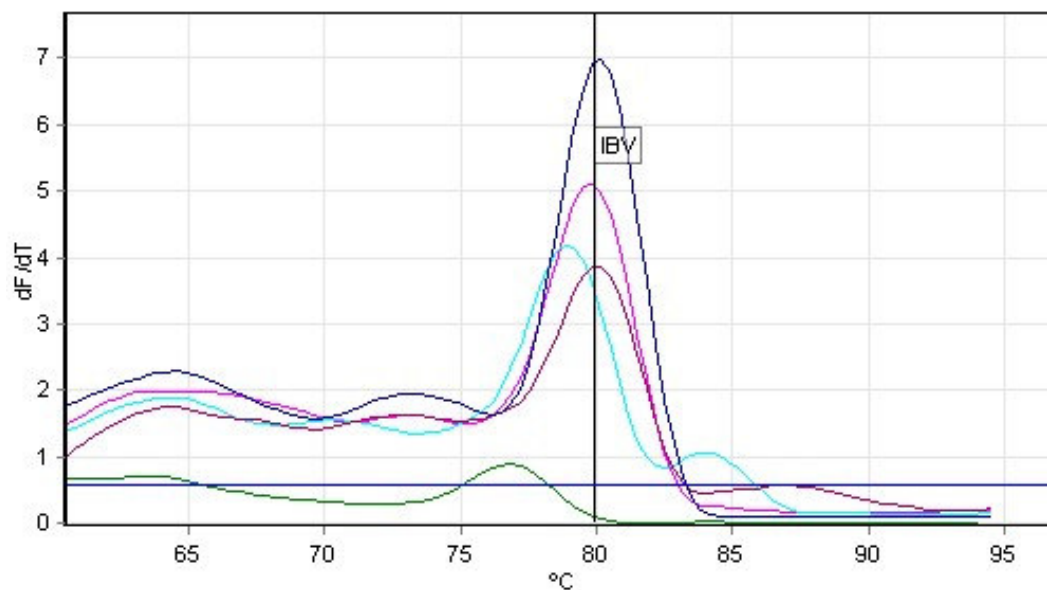
**Figura 15. Patrones de RFLP de una muestra positiva al vBIA (gen que codifica a glicoproteína S1). Columna 1 ADN digerido con enzima *BstYI*, columna 2, digerido con *HaeIII*, y columna 3 digerido con *XcmI*, Línea M (Marcador Molecular, pUC y fago  $\lambda$ -)**

#### **4.3.3 PCR en tiempo real**

A partir del año 2011, se realizó la prueba de PCR en tiempo real mediante la cual se obtuvieron 24 positivas, identificándose de acuerdo a la curva de disociación, 22 cepas del tipo Massachusetts y 2 no identificadas.

En la figura 16 se puede apreciar el que la curva de disociación se encuentra en el mismo punto que la muestra control (serotipo Mass). Sin embargo en la figura 17 la curva de disociación de las muestras difiere de las del control, indicando esto que no corresponden a serotipos Mass.

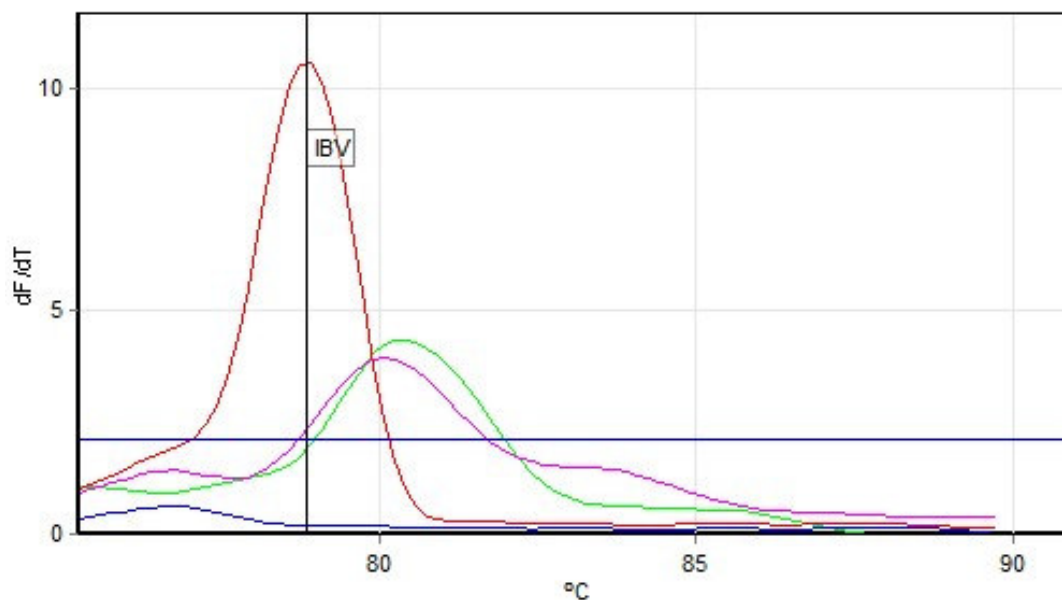
**Figura 16. Detección del vBIA por la prueba de PCR en tiempo real, en una granja de pollos de engorde del departamento de Lima**



**Curvas: Traquea/Pulmón: POSITIVO, Tonsilas cecales: POSITIVO, Riñón: POSITIVO, Control Positivo (vBIA- MASS): POSITIVO, Control Negativo: NEGATIVO**



**Figura 17. Detección del vBIA por la prueba de PCR en tiempo real, en una granja de pollos de engorde del departamento de Lima, con curvas de disociación diferente al control positivo**



No.	Color	Name	Pico	Resultado
1	<span style="color: green;">■</span>	Pulmón/ Tráquea- Gja C-3 -2014	80.35 (IBV)	Positivo
2	<span style="color: magenta;">■</span>	Riñon Gja C-3 -2014	80.10 (IBV)	Positivo
3	<span style="color: red;">■</span>	Control Positivo	78.85 (IBV)	Positivo
4	<span style="color: blue;">■</span>	Control Negativo		Negativo

La tabla 9 detalla los resultados obtenidos con las muestras de pollos de engorde que fueron positivas a la detección e identificación del genoma del vBIA desde el año 2005 al 2014 en departamento de Lima, mediante las pruebas de PCR convencional o PCR en tiempo real y que posteriormente fue identificado el serotipo por RFLP.



**Tabla 9. Resultados de la detección e identificación del vBIA en pollos de engorde del departamento de Lima desde el año 2005 al 2014.**

<b>Detección de vBIA</b>							
<b>Años</b>	<b>N° Granjas</b>	<b>N° de muestras positivas por</b>		<b>N° de muestras negativas</b>	<b>N° de serotipo Identificado</b>		
		<b>RT-PCR Punto final</b>	<b>RT-PCR Tiempo real</b>		<b>BIA Mass</b>	<b>BIA Conn</b>	<b>No definida</b>
<b>2005</b>	33	3		30	3		
<b>2006</b>	26	16		10	16		
<b>2007</b>	59	23		36	19	2	2
<b>2008</b>	10	6		4	6		
<b>2009</b>	8	3		5	3		
<b>2010</b>	6	3		3	3		
<b>2011</b>	6		4	2	4		
<b>2012</b>	6		5	1	5		
<b>2013</b>	9		6	3	6		
<b>2014</b>	13		9	4	7		2
<b>TOTAL</b>	<b>176</b>	<b>54</b>	<b>24</b>	<b>98</b>	<b>72</b>	<b>2</b>	<b>4</b>

## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

En el Perú se han venido usando pruebas serológicas como ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación (IH) como herramientas para el diagnóstico del virus de la bronquitis infecciosa aviar, conjuntamente con la historia clínica y la observación de lesiones compatibles con la enfermedad. La mayoría de veces el diagnóstico era confirmado aislando el virus a partir de los órganos (pulmón y tráquea) en huevos embrionados que mostraban enanismo y encorvamiento entre las 72 a 98 horas post inoculación dando evidencia de una probable presencia del vBIA.

El propósito del estudio fue utilizar un método rápido, efectivo y que permita dar un diagnóstico confirmatorio y definitivo del vBIA en pollos de carne, para lo cual se implementó y optimizó la prueba molecular de RT-PCR convencional. La cepa utilizada para la estandarización fue una cepa de desafío Mass 41 ( $DIE_{50} = 10^5$ ) y 3 cepas vacunales. Una vez implementada la prueba, esta fue utilizada para analizar la presencia del virus de Bronquitis infecciosa en las muestras de fluido alantoideo colectadas de los embriones inoculados con tejidos de órganos respiratorios.

Se analizó la presencia del virus de BIA en 880 muestras de pollos de engorde procedentes de 176 granjas avícolas del departamento de Lima, las muestras fueron colectadas entre los años 2005 al 2014, las mismas que fueron agrupadas en pools de a 5 muestras. Como consecuencia de la inoculación, los embriones mostraron lesiones compatibles con BIA. Sin embargo, el número de embriones con lesiones de BIA no coincidió con el número de muestras positivas a la detección del vBIA por pruebas moleculares. Es así que, del total de 176 fluidos alantoideos, 92 muestras presentaron lesiones severas en el embrión compatibles con el vBIA. Sin embargo, solo 78 muestras fueron positivas al vBIA mediante las pruebas moleculares. Posiblemente esto se debió a la poca cantidad de ARN que estuvo viable en el embrión, o a que este tiende a degradarse muy rápidamente por efecto de la temperatura ambiental o se no mantuvo a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En muchos casos las muestras de fluido alantoideo no fueron procesadas inmediatamente después de su colección y aunque fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , posiblemente se inactivaron, lo recomendable para el almacenamiento es una temperatura de una temperatura de  $-30^{\circ}\text{C}$  (Jackwood & De Wit 2013) esta sería una de las

razones del menor número de muestras encontradas positivas mediante la prueba de RT-PCR, por lo cual se recomienda realizar las pruebas moleculares en fluidos recientemente colectados, para que el ARN viral se mantenga con la calidad y cantidad adecuada. Otra posibilidad es que las muestras hayan sido verdaderamente negativas, los signos, lesiones que causan otros virus respiratorios son similares a los de BIA, como es el caso del Síndrome de Cabeza Hinchada (SCH) que es ocasionada por el Metapneumovirus aviar (APV). Si bien es cierto que en las granjas comprendidas en nuestro estudio no se analizó la presencia de este agente, se detectaron anticuerpos contra APV, en varias de las granjas analizadas. Es importante considerar la presencia de los virus de Bronquitis infecciosa y Metapneumovirus aviar de manera conjunta, ya que en pollos de engorde son comunes las infecciones mixtas por estos dos agentes.

Las 54 muestras de pollos de engorde colectadas del año 2005 al 2010 que resultaron positivas al vBIA, mediante RT-PCR convencional en un solo paso final fueron procesadas mediante la prueba de RFLP para la determinación del serotipo, identificándose el serotipo Massachusetts en 50 muestras, el serotipo Connecticut en 2 muestras. En dos muestras el serotipo no pudo ser identificado. La presencia del serotipo Mass no es rara, ya que los programas de vacunación empleados en estos animales utilizan esta cepa, lo que demostraría la recirculación de los virus vacunales en el campo como también fue observado en Bélgica por Meulemans en el año 2001. Debido a la amplia frecuencia de cambios en la estructura del vBIA es probable que existan cambios en la estructura de la cepa Massachusetts y al no ser totalmente reconocidos por los virus vacunales, sean estos los que estén produciendo los problemas respiratorios en el campo. Por tal motivo sería conveniente realizar un secuenciamiento del gen S1 hallado y compararlo con el de la vacuna utilizada y con otras secuencias para determinar el genotipo del virus que estaría causando los problemas respiratorios con estas cepas.

Las muestras que resultaron positivas hasta el año 2007 pertenecieron a una sola provincia de Lima (Huaaura) donde existe una gran población de granjas de pollos de engorde de crianza intensiva, lo que favorecería a la recirculación de las cepas vacunales ya que cohabitan aves de diferentes edades que son potenciales medios para la replicación y pasaje viral.

Aunque este estudio es el inicio de posteriores investigaciones para determinar la presencia de los serotipos del vBIA en todo el Perú se puede afirmar que en las provincias donde se realizó el estudio, el causante de los problemas de BIA es el mismo serotipo vacunal Massachusetts por lo que es necesario realizar el monitoreo permanente de las cepas circulantes para elaborar adecuadamente las estrategia y programas de vacunación con el fin de que sean las más idóneas para la situación de cada granja.

A partir del 2011 hasta el año 2014 las muestras fueron analizadas para la detección del vBIA por la prueba de PCR en tiempo real obteniéndose 24 muestras positivas al vBIA 22 muestras positivas fueron cepas tipo Mass, y 2 muestras presentaron diferente curva de disociación al que produce la cepa Mass., no pudiendo ser identificado el serotipo No podemos afirmar que en ese momento existe una nueva cepa circulante, pero surge la interrogante porque Villarreal *et al.*, en 2010, reportaron nuevas cepas a las que denominaron: Cepa Brasil, al igual que Marandino en 2013 reportó nuevas variantes sudamericanas y posiblemente un nuevo serotipo se encontraba circulando, por lo que se sugiere realizar el secuenciamiento de los aislados positivos, sobre todo porque las muestras positivas no identificadas con la curva de disociación de Mass fueron procedentes de muestras de riñón y existen reportes a nivel mundial que existen nuevas cepas nefrotóxicas.

La hipótesis planteada para este trabajo de investigación fue: “Los cuadros clínicos respiratorios que presentan los pollos de engorde del departamento de Lima son ocasionados por serotipos diferentes a Massachusetts y /o Connecticut”.

La hipótesis no fue confirmada totalmente, ya que la mayoría de cepas identificadas en el estudio fueron del serotipo Massachusetts, indicando que los problemas respiratorios son principalmente consecuencia de fallas en los procesos de vacunación o manejo de las aves, solo no pudo ser identificado el serotipo en 4 cepas, en donde no se logró la comparación con las bandas de RFLP posterior al RT-PCR en punto final y la curva de disociación en el PCR en tiempo real.

## **CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES**

1. Se optimizó eficazmente la prueba de RT-PCR-RFLP para el diagnóstico del virus de Bronquitis Infecciosa.
2. El serotipo prevalente del virus de Bronquitis Infecciosa encontrado en el departamento de Lima corresponde al tipo Massachusetts.
3. Los cuadros clínicos respiratorios que presentan los pollos de engorde del departamento de Lima, son principalmente ocasionados por la cepa vacunal Massachusetts, y que la cepa Connecticut y otros serotipos tienen un rol menor en la ocurrencia de los procesos respiratorios por Bronquitis infecciosa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo Beiras, A. M. (2010). Bronquitis infecciosa aviar: diagnóstico y control. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 1695, 7504. Recuperado de <http://veterinaria.org/revistas/redvet/n030310/031025.pdf>
- Acevedo Beiras, A. M. (2014). Virus de la Bronquitis infecciosa aviar en dos provincias de la región occidental de Cuba: Detección molecular y diversidad genética. *Revista de Salud Animal*, 36(2), 139-139.
- Abreu, J. T., Resende, J. S., Flatschart, R. B., Folgueras-Flatschart, Á. V., Mendes, A. C. R., Martins, N. R., & Resende, M. (2006). Molecular Analysis of Brazilian Infectious Bronchitis Field Isolates by Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism, and Partial Sequencing of the N Gene. *Avian diseases*, 50(4), 494-501.
- Alvarado, I. R., Villegas, P., Mossos, N., & Jackwood, M. W. (2005). Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. *Avian diseases*, 49(4), 494-499.
- Alvarado, I. R., Villegas, P., El-Attrache, J., & Jackwood, M. W. (2006). Detection of Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus in broilers. *Avian diseases*, 50(2), 292-297.
- Ammayappan, A., Upadhyay, C., Gelb, J., & Vakharia, V. N. (2008). Complete genomic sequence analysis of infectious bronchitis virus Ark DPI strain and its evolution by recombination. *Virology journal*, 5(1), 157.
- Andrade, L. F., Villegas, P., Fletcher, O. J., & Laudencia, R. (1982). Evaluation of ciliary movement in tracheal rings to assess immunity against infectious bronchitis virus. *Avian diseases*, 805-815.
- Armstrong, J., Niemann, H., Smeekens, S., Rottier, P., & Warren, G. (1984). Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature*, 308(5961), 751-752.
- Avellaneda, G. (1992). Estructura del virus de Bronquitis Infecciosa. *Avicultura Profesional*. Vol 10. N 1. *Georgia. EUA*.

- Biarné S, Blanco A, Camprubí Q, Canals N, Porta R. Detección y caracterización molecular de 15 cepas del virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar en España durante el primer semestre del 2011. Recuperado de [http://www.wpsaaeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/6.\\_deteccion\\_y\\_caracterizacion\\_molecular\\_de\\_15\\_cepas\\_del\\_virus\\_de\\_la\\_bronquitis\\_infecciosa\\_aviar.pdf](http://www.wpsaaeca.es/aeca_imgs_docs/6._deteccion_y_caracterizacion_molecular_de_15_cepas_del_virus_de_la_bronquitis_infecciosa_aviar.pdf)
- Bickford, A. (1995). Infectious Bronchitis: Clinical signs and lesions. In *Infectious Bronchitis Workshop. American college of poultry veterinarians. Western poultry disease conference. California USA*.
- Brett, M., Noguera, C., Quiróz, C., Rolo, M., Herrera, A., Martínez, J., & Yufa, B. (2001). Caracterización molecular de cepas del virus de la bronquitis infecciosa aviar aisladas en la región central de Venezuela. *Veterinaria Trop*, 26(1), 15-23.
- Brett, M., De Noguera, C., Quiroz, C., De Rolo, M., Herrera, A., & Martínez, J. (2003). Aislamiento e identificación de tres cepas nefropatógenas del virus de bronquitis infecciosa aviar en la región central de Venezuela. *Veterinaria Trop*, 28(1), 63-77.
- Callison, S. A., Jackwood, M. W., & Hilt, D. A. (2001). Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. *Avian Diseases*, 492-499.
- Callison S. A; Hilt, D. A, Boynton T.O; Sample B.F; Robison R; Swayne D. E; Jackwood M.W (2006) Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens J Virol Methods, 138(1-2):60-5.
- Cavanagh, D., & Naqi, S. A. (2003). Infectious bronchitis. en *Diseases of poultry*, 11, Blackwell Publishing, Iowa, EEUU 101-119.
- Cavanagh, D. & Gelb J. (2008) Infectious Bronchitis. en *Diseases of Poultry*. 12th, Saif, Y.M. Blackwell Publishing, Iowa, EEUU: 117-135.
- Canovas. 1990. Estudio serológico de las enfermedades de Newcastle y Bronquitis infecciosa según la prueba de HI, AGD y ELISA. Instituto de investigaciones avícolas. 17: 7-11
- Chu, H. P., & Uppal, P. K. (1975). Single and mixed infections of avian infectious bronchitis virus and *Mycoplasma gallisepticum*. *Developments in biological standardization*, 28, 101.

- Comotto, E. (2000). Bronquitis Infecciosa. *Enfermedades de las aves*. Edit. Zaga Zeta. Lima Perú, 38-44.
- Cook, J. 1995. Infectious Bronchitis: History, serotypes and its molecular biology in relation to field problems. Infectious Bronchitis Workshop. American college of poultry veterinarians. Western poultry disease conference. California USA.
- Cook, J. K., Orbell, S. J., Woods, M. A., & Huggins, M. B. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathology*, 28(5), 477-485.
- Cook, J. (1999). Serotipos de bronquitis infecciosa y la protección cruzada entre ellos. Curso de enfermedades respiratorias de las aves. *ANECA. México. DF*.
- Cook, JKA. (2002). Infectious Bronchitis: The worldwide situation. *Memorias del X Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar*. Amevea. The University of Georgia, USA.
- Cubillos, A., Ulloa, J., Cubillos, V., & Cook, J. K. (1991). Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. *Avian Pathology*, 20(1), 85-99.
- Cumming, R. B. (1963). Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 39(4), 145-147.
- De Wit, J. J. (2000). Detection of infectious bronchitis virus. *Avian pathology*, 29(2), 71-93.
- De Wit, J. J., Cook, J. K., & Van der Heijden, H. M. (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathology*, 40(3), 223-235.
- Di Fabio, J., Rossini, L. I., Orbell, S. J., Paul, G., Huggins, M. B., Malo, A., ... & Cook, J. K. (2000). Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. *Avian diseases*, 582-589.
- Dhillon, A. Schaberg, D, Bandli. D. 1989. Infectious Bronchitis Vaccination Study and determination of protection post experimental challenge. In *Proceeding of the thirty-eight Wester Poultry disease conference and proceeding of the Monoclonal antibody. Workshop Arizona. USA* (pp. 69-73).



- Dolz, R., Majó, N., Pujols, J., Ordóñez, G. 2003. Caracterización de virus de bronquitis infecciosa aviar aislados en España entre 1992 y 2000. Memoria del cresa 2003.
- Dolz, R., Vergara-Alert, J., Pérez, M., Pujols, J., & Majó, N. (2012). New insights on infectious bronchitis virus pathogenesis: characterization of Italy 02 serotype in chicks and adult hens. *Veterinary microbiology*, 156(3), 256-264.
- Escorcia, M. (1999). El surgimiento de cepas variantes de Bronquitis infecciosa. Curso de enfermedades respiratorias de las aves. *ANECA. México. DF*.
- Fabricant, J. (1998). The early history of infectious bronchitis. *Avian diseases*, 42(4), 648-650.
- Falcone, E., D'Amore, E., Di Trani, L., Sili, A., & Tollis, M. (1997). Rapid diagnosis of avian infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*, 64(2), 125-130.
- Fischer, F., Stegen, C. F., Masters, P. S., & Samsonoff, W. A. (1998). Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *Journal of virology*, 72(10), 7885-7894.
- Gelb Jr, J., Keeler Jr, C. L., Nix, W. A., Rosenberger, J. K., & Cloud, S. S. (1997). Antigenic and S-1 genomic characterization of the Delaware variant serotype of infectious bronchitis virus. *Avian diseases*, 661-669.
- Gelb Jr, J., Ladman, B. S., Tamayo, M., Gonzalez, M., & Sivanandan, V. (2001). Novel infectious bronchitis virus S1 genotypes in Mexico 1998-1999. *Avian diseases*, 1060-1063.
- Gonzalez, J. M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A. E., & Enjuanes, L. (2003). A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Archives of virology*, 148(11), 2207-2235.
- Han, Z., Sun, C., Yan, B., Zhang, X., Wang, Y., Li, C. & Kong, X. (2011). A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(1), 190-200.
- Ignjatović, J., & Sapats, S. (2000). Avian infectious bronchitis virus. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 19(2), 493-508.

- Ignjatovic, J., Ashton, D. F., Reece, R., Scott, P., & Hooper, P. (2002). Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. *Journal of Comparative Pathology*, 126(2-3), 115-123.
- Jackwood, M. W., Kwon, H. M., & Hilt, D. A. (1992). Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. *Avian diseases*, 403-409.
- Jackwood, M. W., Yousef, N. M. H., & Hilt, D. A. (1997). Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. *Avian diseases*, 105-110.
- Jackwood, M. W., Hilt, D. A., Callison, S. A., Lee, C. W., Plaza, H., & Wade, E. (2001). Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus. *Avian diseases*, 366-372.
- Jackwood, M. (2002). Infectious Bronchitis: Future vaccines Against multiple serotypes. *Poultry vaccines and vaccination practice. American Association of avian pathologist. Georgia. USA*, 60-62.
- Jackwood, M. W. (2012). Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian diseases*, 56(4), 634-641.
- Jackwood, M. W., & de Wit, S. (2013). Infectious bronchitis. En *Diseases of poultry*, 139-159.
- Kameka, A. M., Haddadi, S., Kim, D. S., Cork, S. C., & Abdul-Careem, M. F. (2014). Induction of innate immune response following infectious bronchitis corona virus infection in the respiratory tract of chickens. *Virology*, 450, 114-121.
- Keeler Jr, C. L., Reed, K. L., Nix, W. A., & Gelb Jr, J. (1998). Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Diseases*, 275-284.
- Kinde, H., Daft, B. M., Castro, A. E., Bickford, A. A., Gelb Jr, J., & Reynolds, B. (1991). Viral pathogenesis of a nephrotropic infectious bronchitis virus isolated from commercial pullets. *Avian diseases*, 415-421.

- Kwon HM, Jackwood, MW, Gelb. J 1993. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polimerase chain reaction and restricting fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis* 37, 194-202.
- Kwon, H. M., Jackwood, M. W., & Gelb Jr, J. (1993). Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Diseases*, 194-202.
- Lai, M. M., & Cavanagh, D. (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research*, 48, 1-100.
- Lee, C. W., Hilt, D. A., & Jackwood, M. W. (2001). Identification and analysis of the Georgia 98 serotype, a new serotype of infectious bronchitis virus. *Avian diseases*, 164-172.
- Liu, S. W., Zhang, Q. X., Chen, J. D., Han, Z. X., Liu, X., Feng, L., & Tong, G. Z. (2006). Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Archives of virology*, 151(6), 1133-1148.
- Liu, S., Wang, Y., Ma, Y., Han, Z., Zhang, Q., Shao, Y., & Kong, X. (2008). Identification of a newly isolated avian infectious bronchitis coronavirus variant in China exhibiting affinity for the respiratory tract. *Avian diseases*, 52(2), 306-314.
- Luckert, P. (1975). Isolation and identification of avian pathogens. *American Association of avian patologist. Itnaca, New York. USA. pp*, 22-24.
- Malo, A. (1994). La Bronquitis Infecciosa Aviar: Generalidades, diagnóstico y actuales posibilidades de prevención. *VIII Seminario Internacional de Patología aviar. Edit. Pedro Villegas. Georgia, EUA*, 537-553.
- Manual, O. T. Avian infectious bronchitis, 2008. *Chapter*, 2(2), 443-455.
- Marandino, A. (2013). *Diagnóstico y caracterización genética del virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar en la industria avícola regional*. (Tesis de maestría) Recuperado de <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/biol/uy24-16716.pdf>
- Masters, P. S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research*, 66, 193-292.
- Meir R, Maharat O; Farnushi Y; Simanov L (2010) Development of a real-time TaqMan® RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus in chickens, and

comparison of RT-PCR and virus isolation *Journal of Virological Methods* 163 (2010) 190–194

Meulemans, G., Boschmans, M., Decaesstecker, M., Van den Berg, T. P., Denis, P., & Cavanagh, D. (2001). Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. *Avian Pathology*, 30(4), 411-421.

Mondal, S. P., & Cardona, C. J. (2007). Genotypic and phenotypic characterization of the California 99 (Cal99) variant of infectious bronchitis virus. *Virus Genes*, 34(3), 327-341.

Morales, O. E. (1994). Infectious bronchitis overview in Latin America. In *Western Poultry Disease Conference (USA)*.

Naqi, S., Gay, K., Patalla, P., Mondal, S., & Liu, R. (2003). Establishment of persistent avian infectious bronchitis virus infection in antibody-free and antibody-positive chickens. *Avian diseases*, 47(3), 594-601.

Negrete, M. (1995). *Encuesta Serológica de los diferentes serotipos de Bronquitis Infecciosa en broilers en la costa del departamento de Lima* (Tesis de Bachiller para optar el título de médico veterinario). Lima Perú.

Nix, W. A., Troeber, D. S., Kingham, B. F., Keeler Jr, C. L., & Gelb Jr, J. (2000). Emergence of subtype strains of the Arkansas serotype of infectious bronchitis virus in Delmarva broiler chickens. *Avian diseases*, 568-581.

Odor, E. (2000). Actualización, epidemiología, cepas variantes y control de Bronquitis Infecciosa. *VII Seminario Internacional de producción y patología Aviar. AMEVEA. Chile*.

Pohuang T, Chansiripornchai N, Tawatsin A, Sasipreeyajan J. (2009), Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand *J. Vet. Sci.* 10(3), 219-223

Rabenau, H. F., Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Preiser, W., & Doerr, H. W. (2005). Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Medical microbiology and immunology*, 194(1-2), 1-6.

Raj, G. D., & Jones, R. C. (1997). Cross-reactive cellular immune responses in chickens vaccinated with live infectious bronchitis virus vaccine. *Avian Pathology*, 26(3), 641-649.

- Raj, G. D., & Jones, R. C. (1997). Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathology*, 26(4), 677-706.
- Sharma, J. 1994. Avian Respiratory System Immunity. Proceedings of the forty- Third western poultry disease conference. Sacramento California. EUA, pp 55-57.
- Velazco R, Huamanmullo N, Gabancho M Dueñas P, Vivar M, Icochea E, Detección del Virus de la Bronquitis infecciosa directamente de extractos de órganos de aves por PCR en tiempo real. Amevea 2013. Lima Perú.
- Villarreal, L. Y. B., Sandri, T. L., Souza, S. P., Richtzenhain, L. J., De Wit, J. J., & Brandao, P. E. (2010). Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. *Avian diseases*, 54(2), 894-898.
- Villegas, P. 1985. Control de cepas variantes de bronquitis infecciosa: en XIV. Congreso latinoamericano de Avicultura. México 241-245
- Villegas, P. 2000. Reacciones respiratorias postvacunales en pollos de engorde. Poultry Respiratory Conference. Atlanta Georgia.
- Villegas, P. (2000). Reacciones respiratorias postvacunales en pollos de engorde. In *Poultry Respiratory Conference. Atlanta Georgia*.
- Wang, C. H., & Huang, Y. C. (2000). Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Archives of Virology*, 145(2), 291-300.
- Weiss, S. R., & Navas-Martin, S. (2005). Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and molecular biology reviews*, 69(4), 635-664.
- Whiteman, C., & Bickford, A. (1983). Bronquitis Infecciosa. Manual de enfermedades de las aves. Asociación americana de patólogos aviares. pp: 34-38. *Pennsylvania. EUA*.
- Whiteman, C., & Bickford, A. (1989). Infectious Bronchitis. *Avian disease manual. American Association of avian pathologist. Publishing company*, 3, 46-49.
- Yu, L., Jiang, Y., Low, S., Wang, Z., Nam, S. J., Liu, W., & Kwang, J. (2001). Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian diseases*, 416-424.

You, J. H., Reed, M. L., & Hiscox, J. A. (2007). Trafficking motifs in the SARS-coronavirus nucleocapsid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 358(4), 1015-1020.

Zavaleta, A., Icochea, E., Alba, M., & Rosadio, R. (1999). Identificación y tipificación del virus de Bronquitis Infecciosa en pollos por RT-PCR. *APA. Lima-Perú*.

## ANEXO 1:

## FICHA DE REGISTRO EN GRANJA

### Recomendaciones para el muestreo:

Realizar un seguimiento del problema respiratorio a partir de la 3ra semana de edad, cuando el problema pase al 2do galpón se tomarán 5 pollos con signos respiratorios y se remitirán al laboratorio de Patología Aviar FMV – UNMSM, consignando los siguientes datos:

FECHA DE REMISION:.....

ZONA:.....

PLANTEL:.....

GALPON No:.....

Numero de galpones del plantel:.....

Edad de las aves:.....

Numero de aves/galpón:.....

Inicio de signos clínicos respiratorios.....

Porcentaje de pollos afectados.....

Depresión (%): ..... SI ..... NO

Cabeza Hinchada (%): ..... SI ..... NO

Mortalidad por problema (%) ..... SI ..... NO

Consumo de alimento: ..... Normal ..... Medianamente ..... Severamente  
Afectado Afectado

**ANEXO 2:**

**CASO N°**

**FICHA DE REGISTRO EN LABORATORIO**

FECHA DE RECEPCION:.....

ZONA:.....

PLANTEL:.....

GALPON No:.....

Edad de las aves:.....

Número de aves remitidas:..... Vivos ..... Muertos

Depresión (N°): ..... SI .....NO.

Ronquera (N°): ..... SI .....NO.

Boqueo (N°): ..... SI .....NO.

**Hallazgos a la Necropsia:**

Celulitis Facial (N°): ..... SI .....NO

Sinusitis (N°): ..... SI .....NO

Aerosaculitis (N°): ..... SI .....NO

Pericarditis (N°): ..... SI .....NO

Perihepatitis (N°): ..... SI .....NO

Traqueitis (N°): ..... SI .....NO

Material caseoso en bifurcación

de traquea (N°): ..... SI .....NO

Nefritis (N°): ..... SI .....NO

**Muestras tomadas para Histopatología:**

Traquea (N°): ..... SI .....NO

Cornetes nasales: ..... SI .....NO

Riñones (N°): ..... SI .....NO